



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



**Caracterización molecular de la proteína nucleolar
Nop56 de *Leishmania major***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A**

Presenta

PINEDA GARCÍA ISABEL

Director de tesis:

Dr. Tomás Nepomuceno Mejía



Los Reyes, Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo el conocimiento que he adquirido en esta gran institución, por todo el crecimiento profesional y personal que he tenido en mi estancia y por ser mi segunda casa.
- Este proyecto de investigación fue financiado con el apoyo de los donativos 256561 de CONACyT y IA204019 de PAPIIT (DGAPA, UNAM) otorgados al Dr. Tomás Nepomuceno Mejía.
- Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio y por su apoyo durante toda mi estancia en el mismo.
- Al biólogo Luis Enrique Florencio Martínez, por enseñarme a trabajar correctamente en un laboratorio y por todo el tiempo que invirtió explicándome las técnicas para obtener mis resultados.
- Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su apoyo técnico en la obtención de las micrografías de fluorescencia.
- A mis compañeros de laboratorio 1 de la UBIMED; Fabiola, Andrés, Gino, Aldo, Roberto y Sagrario, por compartir su experiencia y tiempo conmigo.
- A mi comité de asesores; al Dr. Santiago Martínez Calvillo, a la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, el Dr. Maximiliano Ibarra Barajas y el Biol. Luis Enrique Florencio Martínez, por las valiosas aportaciones a este proyecto.
- Infinitamente al Dr. Tomás Nepomuceno Mejía, mi tutor, por darme la oportunidad de trabajar con él, por guiarme, compartir sus conocimientos, su paciencia y apoyo en todo el proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis papás; Guillermo y Belén, gracias de todo corazón por creer en mí y ayudarme a cumplir mis sueños, por estar para mí en todo momento. Los amo infinitamente.

A mis hermanos; Carol y Armando, por ser ustedes, por compartir muchas emociones a lo largo de mi licenciatura (y de mi vida). Los amo ♡, gracias por acompañarme siempre (aquí entra Rufo bebé).

A Isaac, gracias por todo el apoyo que me has demostrado en toda la universidad, incluso antes. Gracias por crecer conmigo en todos los aspectos, por cuidarme y acompañarme en cada paso.

A mi familia del corazón; Eve, Adán, su amistad es de mis mayores tesoros, gracias por alegrarse de mis logros y apoyar mis sueños. A mis amigos en la carrera y profesores, en especial al equipo de las chicas; Camila, Alondra, Nancy, Lupita, Aldair, Armando y Sagri, sin ustedes la escuela no habría sido maravillosa, realmente aprecio todo lo que hemos vivido juntos, todas las experiencias en las salidas a campo, en los proyectos, prácticas de laboratorio, tareas, exámenes, horas de estudio, reuniones, en sí todas las clases, realmente hemos pasado muchas situaciones y me alegra que hayan sido ustedes mis compañeros, solo lamento no haber sido tan abierta desde los primeros semestres porque la vida fue más divertida cuando los conocí. ¡Los quiero!. Sagri, has sido una amiga increíble, gracias por tanto conocimiento que compartes conmigo, por todas las comidas en el laboratorio, gracias por ser mi pareja en tantas clases, por las pláticas tan interesantes y los buenos consejos, gracias por escucharme y dejar escucharte. ¡TQM!.

A Tavito, mi compañero de vida, mi alegría, motivación y calma en los días difíciles.

Índice

Resumen	5
Introducción	6
Características generales de los tripanosomátidos	6
Género <i>Leishmania</i>	8
<i>Leishmania</i>	8
Viannia	8
Sauroleishmania	8
Mundinia	9
Leishmaniasis	9
Leishmaniasis visceral	11
Leishmaniasis cutánea	12
Leishmaniasis mucocutánea	14
Ciclo de vida	14
Biología celular del género <i>Leishmania</i>	15
Biología molecular y expresión genética en <i>Leishmania</i>	18
Organización genómica en <i>Leishmania</i>	18
Transcripción policistrónica	19
Splicing en trans	20
Genes ribosomales en <i>Leishmania</i>	20
RNA polimerasa I	22
Nucléolo	23
snoRNPs y la maduración del rRNA	24
Proteína nucleolar 56	26
Antecedentes	28
Objetivos	29
Objetivo general	29
Particulares	29
Metodología	30
Análisis <i>in silico</i> y modelaje tridimensional de LmNop56	30
Cultivo de promastigotes	30
Amplificación de LmNop56 por PCR	31
Generación del vector pGe-LmNop56	31
Transformación bacteriana y purificación del plásmido pGe-LmNop56	31

Generación del vector pNop56-PTP	32
Transformación bacteriana y purificación de vector pNop56-PTP	32
Transfección de promastigotes de <i>L. major</i>	33
Obtención de clonas celulares LmNop56-PTP	33
Obtención de la proteína total de promastigotes	33
Electroforesis en gel de acrilamida	34
Western blot	35
Inmunofluorescencia indirecta	35
Purificación por cromatografía de afinidad en Tándem	36
Preparación de extractos	36
Cromatografía de afinidad IgG	36
Purificación por afinidad con la resina α -Proteína C	37
Resultados	38
Análisis <i>in silico</i> de LmNop56	38
Dominios conservados y estructura secundaria de Nop56	44
Determinación <i>in silico</i> de la estructura terciaria de LmNop56	46
Clonación en el vector pGEMT-Easy	47
Generación del plásmido LmNop56-PTP	50
Obtención y caracterización de poblaciones estables LmNop56-PTP	53
Obtención y caracterización de las líneas celulares LmNop56-PTP	55
Localización subcelular de la proteína LmNop56-PTP	58
Purificación de complejos proteicos asociados con LmNop56-PTP	62
Identidad de las proteínas que co-purificaron con LmNop56-PTP	63
Discusión	71
Logros y conclusiones	79
Referencias consultadas	81

Lista de figuras

Figura 1. Morfología de un tripanosomátido.	- 7 -
Figura 2. Regiones de Leishmaniasis en México.	- 10 -
Figura 3. Leishmaniasis visceral en el mundo.	- 11 -
Figura 4. Leishmaniasis visceral.	- 12 -
Figura 5. Leishmaniasis cutánea.	- 13 -
Figura 6. Leishmaniasis cutánea en el mundo.	- 13 -
Figura 7. Leishmaniasis mucocutánea.	- 14 -
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	- 15 -
Figura 9. Formas de <i>Leishmania</i> .	- 16 -
Figura 10. DNA del cinetoplasto.	- 17 -
Figura 11. Microtúbulos subpeliculares.	- 18 -
Figura 12. Ilustración del proceso de splicing en trans y poliadenilación en tripanosomátidos.	- 20 -
Figura 13. Esquema de la unidad del DNA ribosomal de <i>L. major</i> Friedlin.	- 21 -
Figura 14. Estructura de la RNA pol I de levadura.	- 22 -
Figura 15. El nucléolo.	- 23 -
Figura 16. Representación esquemática de un típico snoRNP caja C/D de eucariotas.	- 25 -
Figura 17. LmNop56.	- 27 -
Figura 18. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Nop56 de cuatro especies de <i>Leishmania</i> .	- 39 -
Figura 19. Comparación de la secuencia de aminoácidos de LmNop56 con tres especies de <i>Trypanosoma</i> .	- 41 -
Figura 20. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Nop56 presente en <i>L. major</i> , <i>Homo sapiens</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	- 43 -
Figura 21. Estructura secundaria y dominios conservados de Nop56 de <i>L. major</i> (Lm) y <i>S. cerevisiae</i> (Sc).	- 45 -
Figura 22. Estructura tridimensional de Nop56 obtenida por medios computacionales.	-46 -
Figura 23. Modelaje computacional paralelo y tridimensional de las secuencia de aa de Nop56 de <i>L. major</i> (azul) y <i>S. cerevisiae</i> (amarillo).	- 47 -
Figura 24. LmNop56 analizado en geles de agarosa.	- 48 -
Figura 25. Plásmido pGe-LmNop56.	- 49 -
Figura 26. Análisis de restricción del pGe-LmNop56.	- 50 -
Figura 27. Gel de agarosa con el vector PTP y LmNop56 puros.	- 51 -
Figura 28. Mapa predicho del plásmido LmNop56-PTP.	- 51 -
Figura 29. Análisis de restricción del plásmido pLmNop56-PTP.	- 52 -
Figura 30. LmNop56 en marco de lectura correcto con la etiqueta PTP.	- 53 -
Figura 31. Representación gráfica de la proteína recombinante LmNop56-PTP.	- 54 -
Figura 32. Caracterización de las tres poblaciones LmNop56-PTP por Western blot.	- 54 -
Figura 33. Western blot de las seis líneas celulares LmNop56-PTP.	- 55 -
Figura 34. Análisis de la expresión de LmNop56-PTP en líneas celulares.	- 56 -

Figura 35. Análisis de la expresión de LmNop56-PTP en la clona 6 evaluada por Western blot.	- 57 -
Figura 36. Análisis de la expresión de LmNop56-PTP.	-58 -
Figura 37. Localización nucleolar de LmNop56-PTP.	- 59 -
Figura 38. Co-localización de la versión recombinante LmNop56-PTP con LmNop56 endógena evaluada por inmunofluorescencia indirecta doble.	- 60-
Figura 39. Micrografías obtenidas con un microscopio confocal en las que se observa la co-localización nucleolar de las dos versiones de LmNop56.	- 61 -
Figura 40. Cortes ópticos seriados de un promastigote transgénico capturados por microscopía confocal.	- 62 -
Figura 41. Imagen del mismo gel de poliacrilamida-acrilamida mostrado en dos canales diferentes.	- 63 -
Figura 42. Resumen gráfico de las proteínas co-purificadas con LmNop56-PTP	- 64 -

Resumen

Leishmania major es el agente etiológico de la leishmaniasis cutánea, enfermedad que afecta a miles de personas que residen en regiones tropicales y subtropicales del viejo mundo. *L. major* es un protozoo de divergencia temprana que posee una diversidad de mecanismos únicos de expresión genética, por lo que representa un modelo biológico interesante para estudiar. En nuestro laboratorio hay interés por conocer la biología del nucléolo de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*. El nucléolo es el cuerpo nuclear más prominente que regula la biogénesis de las subunidades ribosomales, un proceso celular fundamental que involucra la participación de decenas de elementos. Una molécula esencial es la proteína nucleolar 56 (Nop56), que en levaduras es indispensable para el correcto ensamblaje y función de las partículas ribonucleoproteicas nucleolares pequeñas de tipo C/D. El análisis *in silico* del genoma de *L. major* nos permitió identificar el gen ortólogo de Nop56 que está localizado en el cromosoma 10 como copia única. Una vez expresado, produce una proteína de 473 aminoácidos que posee los tres dominios estructurales y funcionales identificados en los ortólogos de otros eucariotas y Arqueas, lo que nos sugirió que en *L. major*, Nop56 podría participar en eventos celulares similares a los descritos en otros organismos. Con base en esta información, generamos una línea celular de *L. major* que expresa la proteína recombinante Nop56 fusionada con una bandera conocida como PTP, herramienta molecular que permitió la purificación (por cromatografía de afinidad en tándem) y la descripción (por espectrometría de masas y análisis *in silico*) de un número importante de proteínas que participan en alguna etapa de la biogénesis de las dos subunidades ribosomales en *L. major*. Los resultados que obtuvimos nos permitirán entender con más profundidad la generación de los ribosomas en estos patógenos del ser humano y también, pueden contribuir a la identificación de posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos o vacunas eficaces que puedan ser empleados en el tratamiento de la leishmaniasis, que es un problema de salud pública serio en una gran diversidad de países, incluido México.

Introducción

Características generales de los tripanosomátidos

Los tripanosomátidos son protozoos unicelulares flagelados de importancia médica y económica debido a que algunos miembros de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* son los agentes etiológicos de enfermedades como la tripanosomiasis africana, la tripanosomiasis americana y distintas versiones de leishmaniasis, parasitosis que constituyen serios problemas de salud pública alrededor del mundo. Estos padecimientos infecciosos causan miles de muertes cada año, la gran mayoría en regiones pobres con deficientes sistemas de salud y saneamiento (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

Los protozoos patógenos del orden Kinetoplastida como *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* o diversas especies del género *Leishmania* son parásitos intra o extracelulares con ciclos de vida bastante complejos, alternan entre diversos estadios de desarrollo y requieren parasitar dos organismos de diferente especie. El primero de estos son insectos dípteros hembra que pueden actuar como sólo el vector o ser el hospedero definitivo, mientras que el segundo hospedero suelen ser organismos vertebrados entre los que se incluyen el ser humano y animales domésticos, de importancia veterinaria o de vida salvaje (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2010; Maslov, *et al.*, 2001).

Estos parásitos, que divergieron tempranamente del linaje de los eucariotas, son biológica y evolutivamente dignos de interés debido a que poseen características únicas a nivel genético, bioquímico y citológico. En este contexto, los tripanosomátidos contienen organelos especiales que están ausentes en otros eucariotas o que realizan funciones exclusivas en estos protozoos. Entre otros, destacan el cinetoplasto, los glicosomas y los microtúbulos subpeliculares (Figura 1). También se ha reportado que presentan mecanismos de expresión genética poco comunes para eucariotas; por ejemplo, la síntesis de RNA comienza en regiones muy particulares de cada cromosoma, realizan transcripción policistronica,

splicing en *trans*, y presentan genes ribosomales polifragmentados. Además, el arreglo genómico entre las distintas especies de tripanosomátidos es altamente sinténico (Padilla-Mejía *et al.*, 2013; Martínez-Calvillo *et al.*, 2007, 2010; Parsons, 2004).

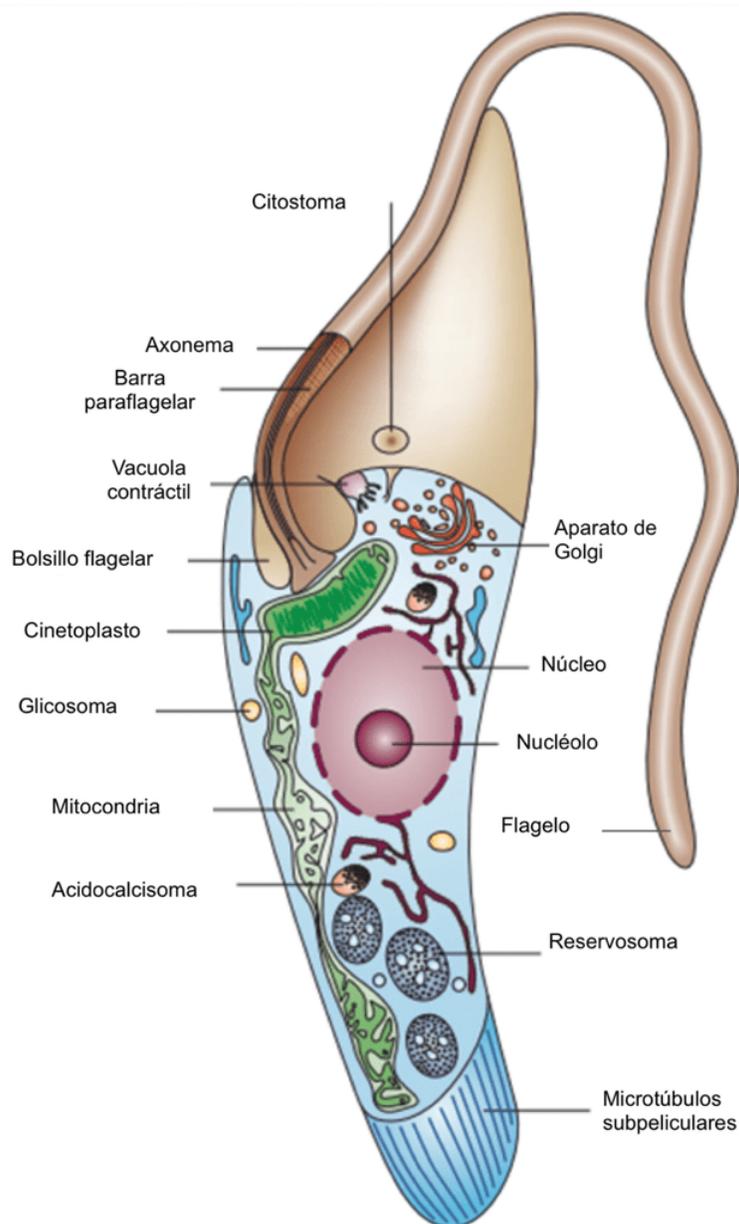


Figura 1. Morfología de un tripanosomátido. Esquema representativo de un tripanosomátido, donde se ilustra la posición de varios organelos. El bolso flagelar marca la parte anterior del organismo. Figura tomada de Docampo, *et al.*, 2005.

Género *Leishmania*

El género *Leishmania* fue observado por primera vez por David Cuningham en 1885 y después por Peter Borovsky en 1898. Sin embargo, fue formalmente descrito, de manera independiente, por William Leishman y Charles Donovan a principios de la primera década de 1900 (Padilla-Mejía *et al.*, 2013). Con base en datos obtenidos de análisis moleculares, actualmente son ampliamente aceptados los subgéneros *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* y *Mundinia* (Bates, 2007; Butenko, *et al.*, 2019).

Leishmania

Estos parásitos son ingeridos por los vectores (hematófagos hembra) como amastigotes (presentes en heridas de la piel o en la sangre de diversos mamíferos), el cambio de hospedero favorece un proceso de transformación celular al estadio promastigote procíclico. Estos parásitos permanecen en el intestino medio anterior del insecto, son capaces de adherirse a las microvellosidades, evitando así la expulsión por defecación, esta es una característica importante de este subgénero (Bates, 2007; Butenko, *et al.*, 2019). Miembros de relevancia médica incluyen a *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica* y *L. mexicana*.

Viannia

L. braziliensis y *L. panamiensis* únicamente se encuentran en las Américas y son transmitidas por insectos del género *Lutzomyia*. Estos protozoos se caracterizan por migrar hacia la región pilórica del intestino posterior del insecto después de transformarse en promastigotes procíclicos (Bates, 2007).

Sauroleishmania

Este subgénero no es patógeno para el humano, pues sólo afecta a reptiles en el Viejo Mundo. Los vectores transmisores son diversas especies de *Sergentomyia* spp., quienes ingieren promastigotes o amastigotes al momento de alimentarse. Dentro de la mosca de la arena, *Leishmania* se reproduce dentro de la matriz

peritrófica. Posteriormente, las células se trasladan hacia el intestino grueso (Bates, 2007).

Mundinia

En este grupo encontramos especies patógenas tanto para el humano como para otros animales, destacan *L. orientalis*, *L. enrietti*, *L. martiniquensis* y *L. macropodum* que fue encontrada en macrópodos australianos (mamíferos marsupiales). Un aspecto relevante de este grupo es la posible exploración de nuevos nichos ecológicos que favorezcan su desarrollo, como ejemplo importante, están las personas inmunosuprimidas. El vector que usan no necesariamente pertenece a la familia de *Phlebotomus* o *Lutzomyia*, estos organismos establecen interacciones biológicas con miembros de otros géneros. Finalmente, las filogenias señalan que *Leishmania Mundinia* es la rama más antigua de todas las Leishmanias, lo que sugiere que su origen tuvo lugar antes de la disolución de Gondwana (Butenko, *et al.*, 2019).

Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos flagelados del género *Leishmania* que son transmitidos a los seres humanos por flebótomos hematófagos hembra, conocidos como moscas de la arena. Este padecimiento infeccioso está esparcido alrededor del mundo, específicamente en las regiones tropicales y subtropicales de 98 países. Existen alrededor de 70 especies animales que actúan como reservorio natural de *Leishmania*, entre éstas se encuentran los roedores, los perros y los humanos (OMS, 2020; Roberts, *et al.*, 2000), que pueden ser infectados por cerca de 53 especies diferentes de *Leishmania* (Wheeler, *et al.*, 2011).

Se ha estimado que *Leishmania* mantiene bajo infección alrededor de 12 millones de personas, genera de 1.2 a 2 millones de nuevos casos y produce entre 20,000 a 40,000 defunciones por año a nivel mundial (Fiebig, *et al.*, 2015). En México se han registrado casos de leishmaniasis en Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Hidalgo,

San Luis Potosí, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Morelos y Puebla (Figura 2). Aunque la incidencia es baja, si se compara el número de casos contra el total de habitantes de nuestro país, la leishmaniasis es una enfermedad vigente que debe estar sometida a vigilancia epidemiológica estricta. Según cifras de la Dirección General de Epidemiología, en México se reportaron 728 nuevas infecciones durante el año 2019 divididas en 726 casos de leishmaniasis cutánea y dos de leishmaniasis visceral.



Figura 2. Regiones de Leishmaniasis en México. La Región del Golfo se observa en color rojo. La zona centro en verde y la del pacífico en amarillo. Imagen tomada de Sectorial De Salud, 2013.

Las personas infectadas con *Leishmania* pueden padecer alguna de las tres formas principales de la enfermedad (cutánea, mucocutánea o visceral) o bien, presentar todas de manera simultánea (Kedzierski, *et al.*, 2006; OMS, 2020; Roberts, *et al.*, 2000).

Leishmaniasis visceral

A esta forma de la infección también se le conoce como Kala-azar y se han reportado casos en países tropicales y subtropicales (Figura 3). Es el tipo de leishmaniasis más severa, llega a ser mortal hasta un 95% de los casos, si no se recibe tratamiento oportuno.

Estados de la endemias de Leishmaniasis visceral (LV) en el mundo, 2018

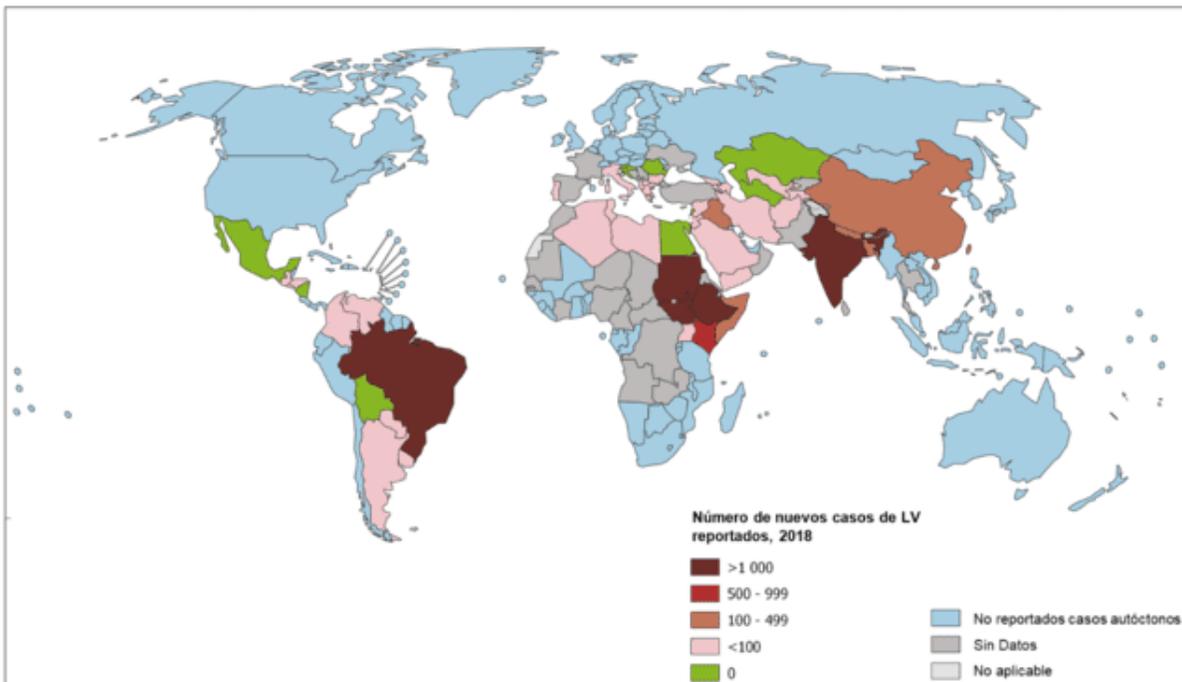


Figura 3. Leishmaniasis visceral en el mundo. Imagen tomada de: ©World Health Organization, 2018.

Este tipo de leishmaniasis se caracteriza por presentar síntomas como fiebre, pérdida de peso, anemia, hepatoesplenomegalia e inmunosupresión (Figura 4), esta última compromete seriamente la salud de la persona al favorecer el desarrollo de enfermedades secundarias. Los agentes etiológicos responsables de esta clase de infección corresponden a las especies de *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*. Estimaciones de la OMS indican que cada año se producen entre 50,000 y 90,000 nuevos casos de esta enfermedad (OMS, 2020).



Figura 4. Leishmaniasis visceral. Paciente con pérdida de peso y presencia de hepatoesplenomegalia. Imagen tomada de la OMS, 2020.

Leishmaniasis cutánea

Los pacientes presentan una úlcera (Figura 5) en el lugar donde picó la mosca de la arena, aunque se cura espontáneamente, puede aparecer una marca pasados entre tres y seis meses. Las principales especies que causan esta manifestación son *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, y *L. mexicana*, aunque *L. braziliensis* y *L. panamensis* también llegan a producirla. Una variante de esta enfermedad es la leishmaniasis cutánea difusa (causada principalmente por *L. aethiopica*, *L. amazonensis* y *L. mexicana*) que, como su nombre lo indica, deja lesiones diseminadas en varios sitios de la piel. Cabe mencionar que ésta es la forma más común de la infección ya que supera el 50% de los casos reportados de leishmaniasis cada año (Kedzierski, *et al.*, 2006). En el mapa de la figura 6 se muestran los países con más casos de este tipo de leishmaniasis. Al año se producen entre 600,000 a 1 millón de nuevos casos (OMS, 2020).



Figura 5. Leishmaniasis cutánea. Úlcera característica, redondeada con bordes acordonados, base infiltrada y centro granuloso. Imagen tomada de la OMS, 2020.

Estatus de la endemicidad de Leishmaniasis cutánea (LC) en el mundo, 2018

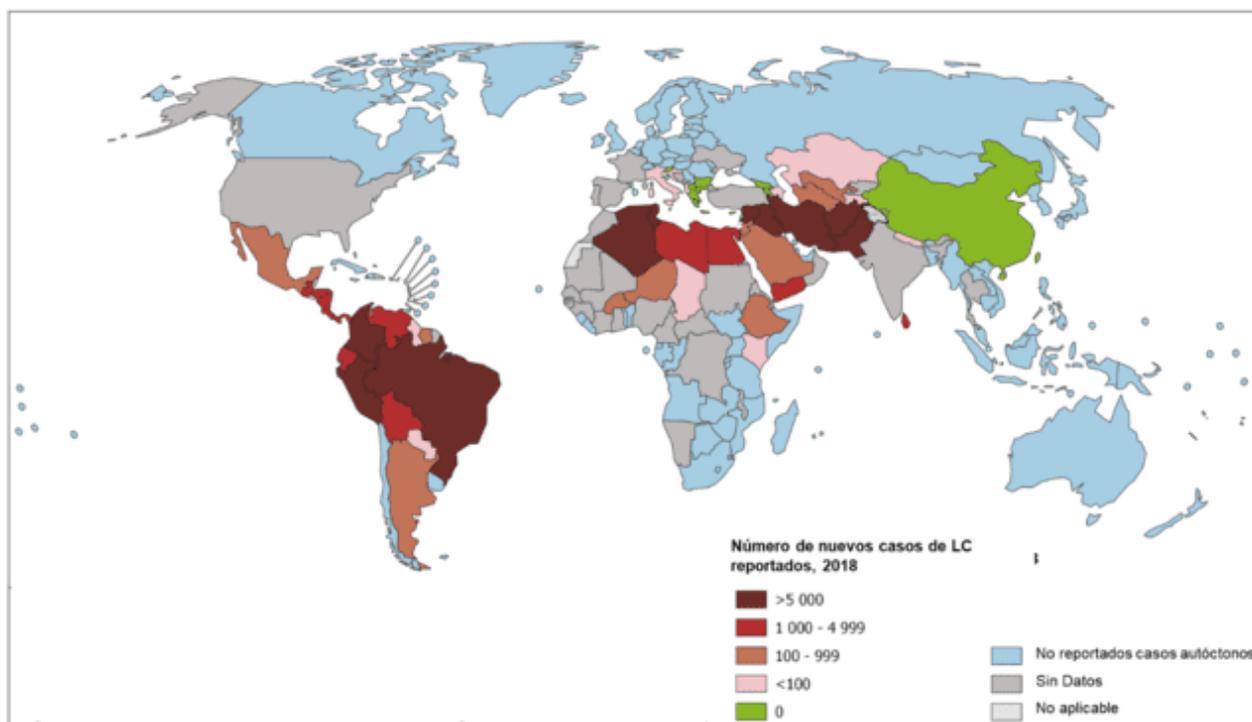


Figura 6. Leishmaniasis cutánea en el mundo. Se muestran los países donde se han reportado casos de leishmaniasis cutánea. Como se puede notar, México se encuentra entre las naciones que han informado la enfermedad. Imagen tomada de: ©World Health Organization, 2018.

Leishmaniasis mucocutánea

No es muy común, pero puede suceder años después de contraer leishmaniasis cutánea, cuando el desarrollo de las lesiones resulta en la destrucción parcial o total de membranas mucosas de la nariz, boca y garganta (Figura 7). El 90% de los casos se han reportado en Brasil, Etiopía, Bolivia y Perú.



Figura 7. Leishmaniasis mucocutánea. El proceso inflamatorio se ha extendido por contigüidad a la piel vecina del ala nasal, el labio superior y la mejilla. Imagen tomada de la OMS, 2020.

Ciclo de vida

La leishmaniasis es una enfermedad transmitida por artrópodos hematófagos hembra de los géneros *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) o *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo). La infección de los mamíferos (incluidos los humanos) comienza cuando promastigotes metacíclicos extracelulares (forma infectiva) son inoculados en la dermis a través de la picadura de una pequeña mosca de la arena que requiere sangre para el desarrollo óptimo de sus huevos (Figura 8). Los promastigotes son engullidos por distintos tipos de células fagocíticas del sistema inmune. Dentro de los macrófagos, los promastigotes se diferencian en amastigotes (estadio intracelular obligado) en los fagolisosomas o vacuolas parasitóforas. Después de múltiples rondas de replicación por fisión binaria, los amastigotes producen la lisis de la célula hospedera para ser liberados e invadir a otros macrófagos o bien,

propagarse por vía circulatoria o linfática para infectar el hígado, el bazo o la médula ósea. Ante la necesidad de nutrientes, la mosca de la arena puede adquirir *Leishmania* cuando ingiere la sangre de mamíferos contaminada con amastigotes libres o macrófagos con amastigotes en el citoplasma. Un nuevo proceso de diferenciación ocurre en el interior del insecto vector, los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, estadio replicativo que se multiplica activamente en el intestino. Después de adherirse a las células epiteliales intestinales y de transitar por diversas formas de desarrollo intermedias (nectomonada o leptomonada) son generados los promastigotes metacíclicos. Estas formas infectivas son liberadas y migran hacia las glándulas salivales del vector. Por regurgitación, la mosca de la arena hembra introduce parásitos en combinación con factores inmunomoduladores y componentes de la saliva en áreas expuestas de la piel para comenzar un nuevo ciclo de infección (Figura 8) (Borghí, *et al.*, 2017; Florin-Christensen & Schnittger, 2018; Maslov, *et al.*, 2001).

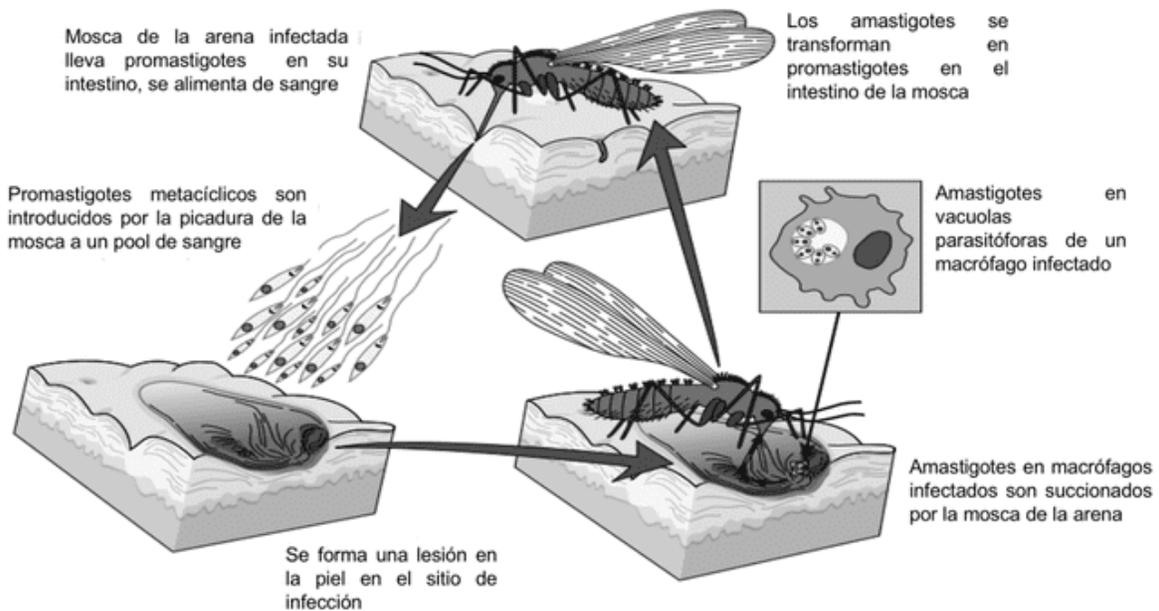


Figura 8. Ciclo de vida de *Leishmania*. Tomado de Kedzierski, *et al.*, 2006

Biología celular del género *Leishmania*

El género *Leishmania* presenta dos formas de desarrollo principales a lo largo de su ciclo de vida, los amastigotes y los promastigotes (Figura 9). Ambos estadios son el resultado de una adaptación hacia las diferentes condiciones ambientales que experimentan en el mamífero que infectan y en la mosca de la arena que los transmite (Besteiro, *et al.*, 2007). Los promastigotes residen en el tracto intestinal del vector, tienen forma elongada, y pueden llegar a medir 20 μm de largo por 3 μm de ancho (sin tomar en cuenta el flagelo) (Figura 9A). Poseen un núcleo central, un nucléolo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, un cinetoplasto desplazado hacia la parte anterior, donde emerge su flagelo desde la bolsa flagelar (Figura 1) (Ambit, *et al.*, 2011; OMS, 2020). Por otro lado, los amastigotes residen en fagolisosomas de macrófagos del mamífero hospedero, presentan una morfología oval y un tamaño de entre 3-5 μm de diámetro. Poseen un núcleo, un cinetoplasto y otros organelos esenciales (Figura 9 B) (Rodríguez, 1983 y Ambit, *et al.*, 2011).

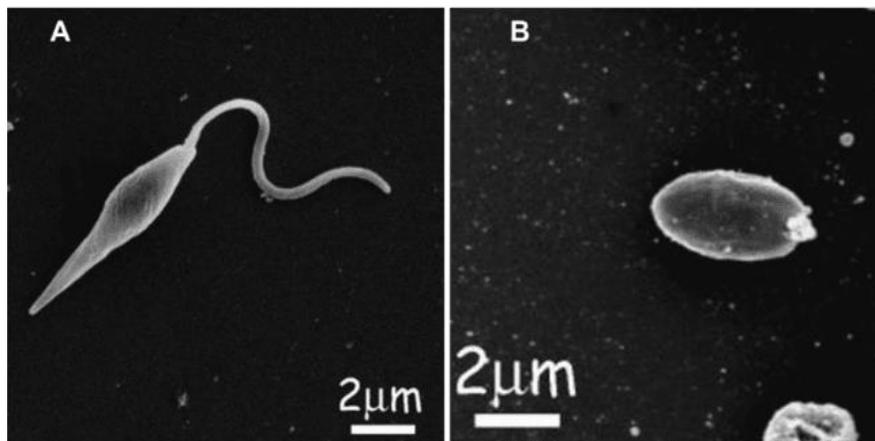


Figura 9. Formas de *Leishmania*. Imágenes de microscopio electrónico de barrido. A) Promastigote procíclico aislado de cultivo celular. B) Amastigote aislado de macrófago infectado de ratón. Imagen tomada de (A) (Besteiro, *et al.*, 2007) (B) (Pothirat, *et al.*, 2014).

El organelo que define al orden Kinetoplastida es el cinetoplasto, que está formado por una red intrincada de maxicírculos y minicírculos formados por el DNA de la mitocondria (Figura 10) (Liu, *et al.*, 2005). Debido a este tipo de organización, es el genoma mitocondrial más complejo que existe (Lukeš, *et al.*, 2002). Los

maxicírculos tienen un tamaño de entre 20 a 40 Kb, codifican para RNA ribosomal (rRNA), proteínas de la cadena respiratoria y algunos genes encriptados, que al ser transcritos están sujetos al proceso de edición del RNA para producir mRNAs funcionales. La realización correcta de esta reacción requiere la participación de un número elevado de RNAs guía mitocondriales, la mayor parte están codificados en los minicírculos (Lukeš, *et al.*, 2002).

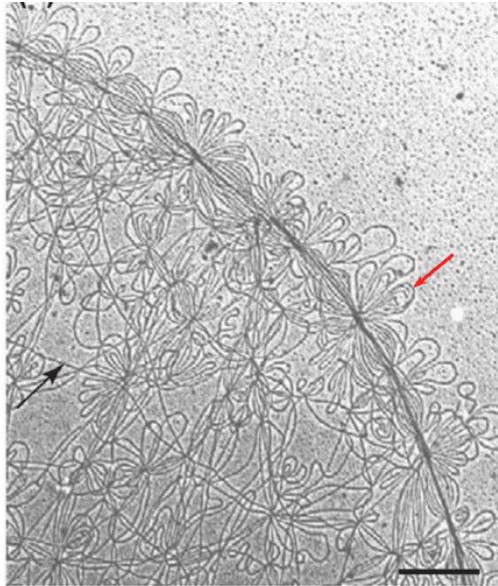


Figura 10. DNA del cinetoplasto. Micrografía electrónica de transmisión que muestra el DNA mitocondrial de *Crithidia fasciculata*. Segmento de una red intacta, los loops pequeños (flecha roja) son minicírculos mientras que la flecha negra señala un fragmento de un maxicírculo. Escala de la barra= 0.3 μ m. Imagen tomada de Liu, *et al.*, 2005.

Como otros tripanosomátidos, *Leishmania* spp. poseen microcuerpos citosólicos particulares que no contienen DNA y están delimitados por una membrana lipídica simple conocidos como glicosomas (Figura 1). Dentro de estos organelos se concentran enzimas claves que participan en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, tioles, purinas y pirimidinas. Los glicosomas son el centro metabólico del parásito, son indispensables para favorecer la adaptación y la sobrevivencia en ambientes hostiles como el intestino del insecto vector y el interior de las células fagocíticas (Jamdhade, *et al.*, 2015).

Otra característica importante de los cinetoplástidos son los microtúbulos subpeliculares (Figura 11). Estas estructuras están formadas, principalmente, por

dímeros de α/β -tubulina, que recorren longitudinalmente el cuerpo de la célula, por debajo de la membrana plasmática, formando una especie de corsé que define la amplia gama de morfologías celulares intermedias que el microorganismo presenta durante su ciclo de vida (Figuras 1 y 11) Los microtúbulos son los constituyentes más abundantes del citoesqueleto en los tripanosomátidos (Sinclair & de Graffenried, 2019).

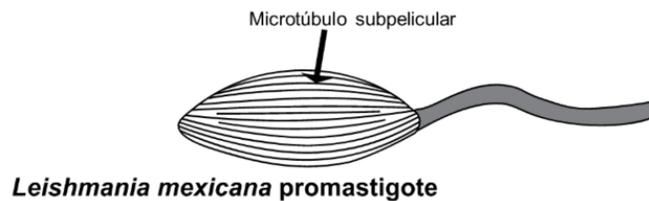


Figura 11. Microtúbulos subpeliculares. Representación esquemática del corsé de microtúbulos subpeliculares del estadio promastigote de *L. mexicana*. Tomado de Sinclair & de Graffenried, 2019.

Biología molecular y expresión genética en *Leishmania*

El género *Leishmania* resulta de interés biológico porque posee peculiaridades en la organización de su genoma, así como mecanismos de expresión génica que resultan inesperados para un miembro del linaje eucariota.

Organización genómica en *Leishmania*

El tamaño del genoma y el número de cromosomas en organismos del género *Leishmania* es diferente entre las especies que lo componen. En *L. major* Friedlin, la cepa de referencia del proyecto del genoma de *Leishmania*, fueron descritas 32.8 megabases (Mb) distribuidas en 36 cromosomas relativamente pequeños de 0.3 a 2.8 Mb que, en conjunto contienen 8272 genes codificantes de proteína, 911 genes de RNA no codificante y 39 pseudogenes. Además, ha sido determinado que cada Mb de DNA nuclear contiene en promedio 252 genes que codifican para proteínas, la mayoría de estos genes están separados uno de otro por regiones intergénicas, con un tamaño que oscila alrededor de los 2,000 pares de bases, en las que están incluidos elementos de secuencia cardinales para la generación de mRNA maduros (Ivens, *et al.*, 2005; Martínez-Calvillo, *et al.*, 2010). Un número elevado de los genes de *L. major* tienen ortólogos en *T. brucei* y *T. cruzi* aunque existe información

genética exclusiva de cada especie, esto ayuda a explicar las diferencias metabólicas observadas entre los tripanosomátidos (Ivens, *et al.*, 2005). Las regiones teloméricas de los cromosomas del género *Leishmania* son, como en otros eucariotas, repeticiones de la secuencia GGGTTA. El genoma de *L. major* no contiene retrotransposones activos y presenta muy pocas secuencias polimórficas (menos del 0.1%) lo que contrasta considerablemente con lo encontrado en el genoma de otros tripanosomátidos (Padilla-Mejía *et al.*, 2013 y Martínez-Calvillo, *et al.*, 2010).

Transcripción policistrónica

Como en otros tripanosomátidos, en *L. major* los genes se encuentran organizados en unidades policistrónicas largas que agrupan decenas o cientos de genes dispuestos secuencialmente en alguna de las hebras del DNA bicatenario. En contraste con los operones bacterianos, en general estos genes no guardan relación funcional entre sí (Figura 12) (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2010). En la mayoría de los cromosomas están presentes al menos dos unidades policistrónicas que son transcritas, de forma convergente (hacia el centrómero) o divergente (hacia el telómero) por el complejo enzimático de la RNA polimerasa II (RNA pol II). La transcripción termina cuando dos unidades convergen o cuando se alcanza una región que es transcrita por otra RNA polimerasa (Clayton, 2019). El precursor policistrónico (pre-mRNA) es procesado co-transcripcionalmente en el nucleoplasma por splicing en *trans* y por poliadenilación para generar mRNAs monocistrónicos, como se muestra en la Figura 12 (Martínez-Calvillo *et al.*, 2012 Padilla-Mejía *et al.*, 2013).

Splicing en trans

El splicing en *trans* es un proceso nuclear que involucra dos reacciones de transesterificación para fusionar un RNA de 39 nucleótidos, conocido como miniexón o *spliced leader*, con el extremo 5' de los pre-mRNAs (Figura 12). Durante el splicing en *trans* se origina una estructura intermedia característica en forma de "Y" que es producto de la primera transesterificación (Preußner, *et al.*, 2012). El miniexón provee a cada mRNA la caperuza o 5' cap, que en tripanosomátidos es

atípica y está hipermetilada. El splicing en *trans* es realizado por un repertorio de RNA pequeños nucleares (snRNAs) ricos en uridina asociados con más de 150 proteínas (Michaeli, 2011; Preußner, *et al.*, 2012).

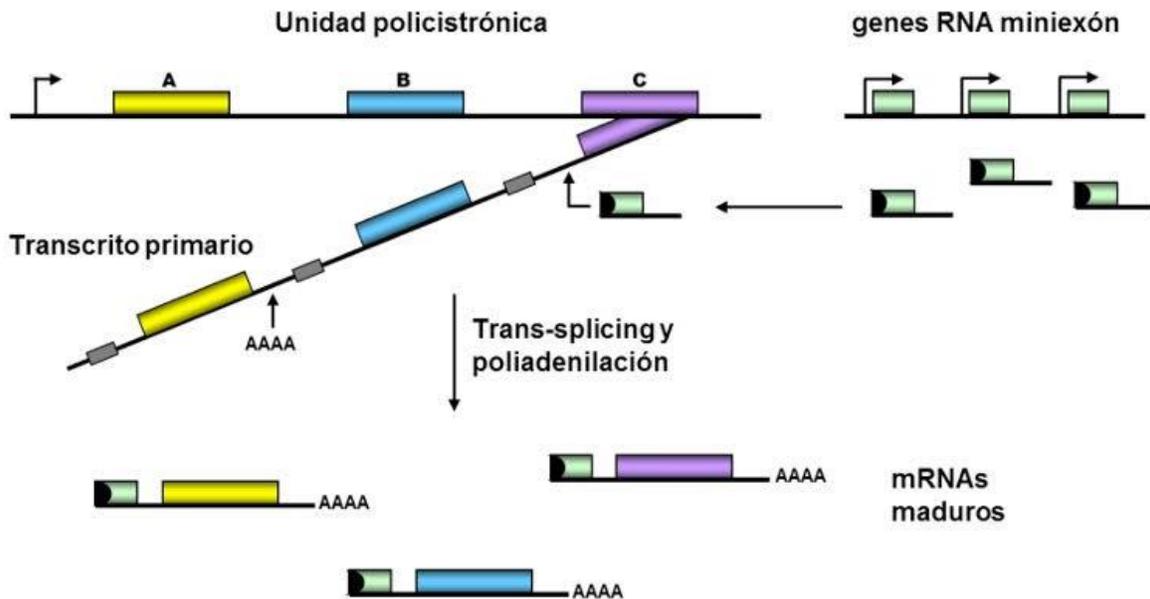


Figura 12. Ilustración del proceso de splicing en *trans* y poliadenilación en tripanosomátidos. Se observa una unidad policistrónica que contiene los genes A, B y C separados uno de otro por regiones intergénicas. La única posición de inicio de la transcripción se localiza río arriba del gen A (flecha negra). La RNA pol II genera un transcrito primario largo que contiene regiones ricas en pirimidinas (cajas grises) en el extremo 3' de cada gen que son esenciales para generar mRNA individuales, para la unión del miniexón (RNA de 39 nucleótidos que dona la estructura cap; semicírculo negro) y para la poliadenilación (unión de la cola de adeninas en el extremo 3') (Cortázar & Walker, 2004). El resultado de estas modificaciones es un RNAm maduro que será traslocado al citoplasma para su traducción. Figura tomada de Martínez-Calvillo *et al.*, 2012.

Genes ribosomales en *Leishmania*

Como ocurre en otro tipo de células, en *L. major* los genes de rRNA 18S, 5.8S y 28S forman parte de una misma unidad de transcripción (aquí referida como cistrón ribosomal o rDNA; Figura 13). En el genoma haploide de *L. major* están contenidas alrededor de 12 copias del rDNA arregladas en tándem de la forma canónica “cabeza-cola” ordenadas en el cromosoma 27 (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2001). Curiosamente, con base en la distribución de nucleosomas y de marcas epigenéticas a lo largo del cistrón ribosomal, se ha sugerido que en promastigotes de *L. major* metabólicamente activos, solamente se encuentran genes ribosomales

que son competentes para transcripción (Vizuet-de-Rueda, *et al.*, 2016). Este hallazgo es relevante y contrasta con lo reportado en otros eucariotas en donde una fracción significativa de las copias del rDNA están silenciadas o en estado inactivo por mecanismos epigenéticos (Kresoja-Rakic & Santoro, 2019). Cada cistrón ribosomal está separado de otro por un espaciador intergénico de tamaño variable que contiene secuencias que participan en regular la síntesis del transcrito primario, destacan el propio promotor, el sitio de inicio de la transcripción, potenciadores (enhancers) y terminadores (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2019). Similar a lo descrito en diferentes tripanosomátidos, en *L. major* la secuencia codificante del gen del rRNA 28S está fraccionada en las especies ribosomales 24S α (LSU α), 24S β (LSU β), γ , δ , ζ y ϵ alternadas entre sí por cinco espaciadores transcritos internos (Figura 13). Un evento particular en el genoma de *L. major*, es la presencia de una duplicación del gen ϵ en algunos cistrones ribosomales, sin embargo, la funcionalidad de este módulo extra aún es desconocida (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2001).

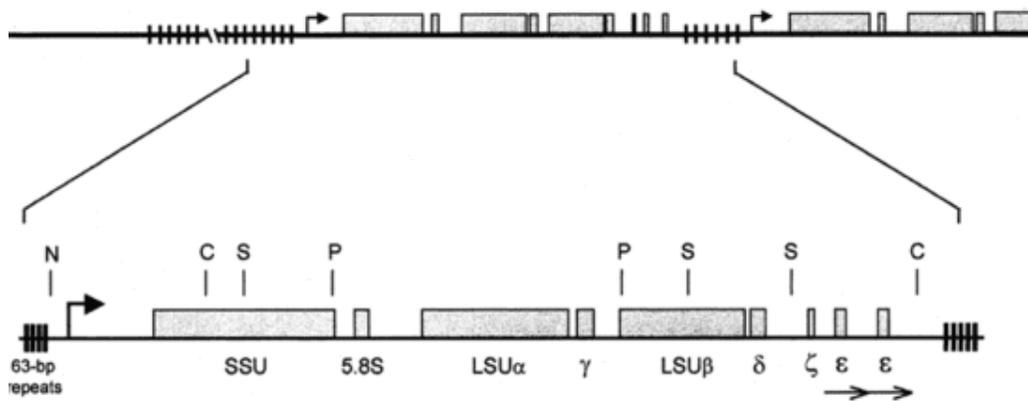


Figura 13. Esquema de la unidad del DNA ribosomal de *L. major* Friedlin. Las flechas en el espaciador intergénico indican los sitios de inicio de la transcripción. Son ilustradas las regiones codificantes para el rRNA 18S (SSU), 5.8S y el rRNA 28S fragmentado en 24S α (LSU α), γ , 24S β (LSU β), δ , ζ , ϵ . En este ejemplo se incluye la duplicación del módulo ϵ (flecha doble). Las letras sobre las regiones codificantes indican secuencias de nucleótidos que son reconocidas por las enzimas de restricción Sacl (S), SaclI (C), PstI (P) y Ndel (N). Imagen tomada de Martínez-Calvillo, *et al.*, 2001.

RNA polimerasa I

La RNA polimerasa I (RNA pol I) es el complejo multiproteico responsable de la síntesis de más del 70% del RNA total de la célula debido a que transcribe las

numerosas copias del rDNA concentradas en la región fibrilar del nucléolo. En células humanas se ha estimado que alrededor de 100 a 120 moléculas de RNA pol I pueden asociarse a un mismo cistrón ribosomal activo y transcribirlo secuencialmente (Dundr & Misteli, 2001). En levaduras, esta enzima está estructurada por 14 polipéptidos con diferente masa molecular y funcionalidad, como se ilustra en la Figura 14 (Fernández-Tornero, *et al.*, 2013). Mediante análisis bioinformáticos y de espectrometría de masas en los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* se han identificado varias subunidades de la RNA pol I incluyendo a RPA1, RPA2, RPA12, RPC19, RPC40, RPB8, RPB12 y los polipéptidos RPB5z, RPB6z, RPB10z y RPA31 que son exclusivos de los tripanosomátidos (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2019; Nguyen, *et al.*, 2006, 2007; Wilkinson & Kelly, 2003).

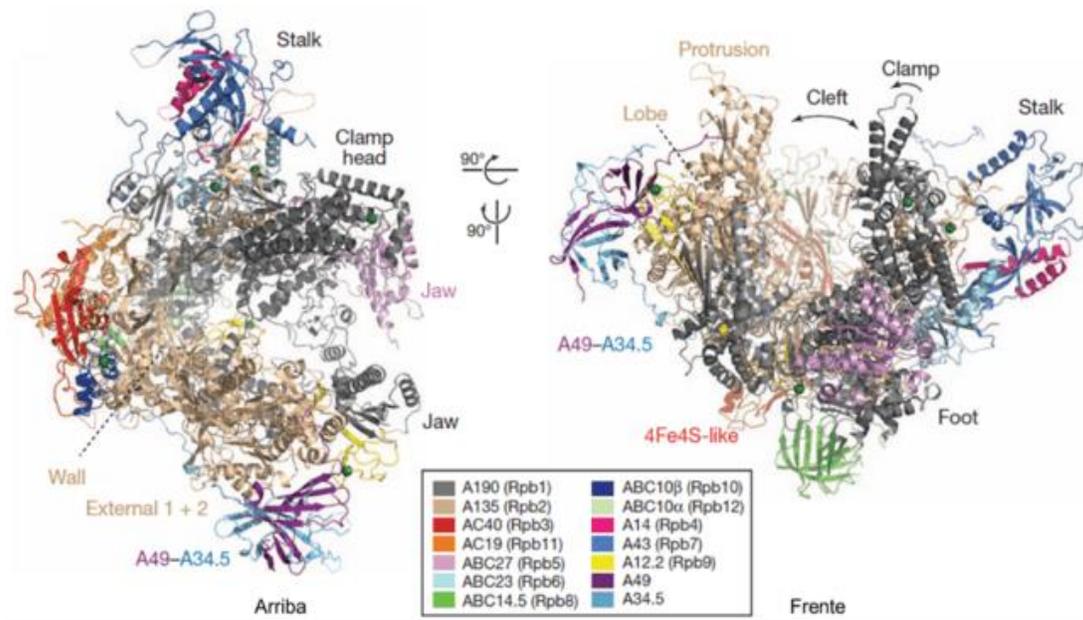


Figura 14. Estructura de la RNA pol I de levadura. El código de colores indica las catorce subunidades de la holoenzima. Los puntos verdes son iones de Zn^{2+} . Figura tomada de Fernández-Tornero, *et al.*, 2013.

Nucléolo

El nucléolo es un cuerpo nuclear dinámico y prominente que participa activamente en la regulación de la expresión génica (Hernandez-Verdun, 2011; Nunes & Moretti, 2017). Se considera que este organelo intranuclear fue evolutivamente modelado con la finalidad de optimizar la biogénesis ribosomal, proceso complejo que inicia con la transcripción del rDNA, por la RNA pol I y sus factores asociados, en la región

fibrilar del nucléolo (Hernandez-Verdun, 2011). Este cuerpo nuclear se ensambla alrededor de las regiones organizadoras nucleolares que contienen los *clusters* de rDNA y que están localizadas en uno o varios cromosomas acrocéntricos (McStay, 2016). Dependiendo de la especie, el nucléolo puede estar estructurado por dos o tres subdominios principales que difieren en morfología, en composición molecular y en funcionalidad (Figura 15). Como se ha observado en una amplia diversidad de células eucariotas, el nucléolo de *Leishmania* y *Trypanosoma* es bipartita con un componente fibrilar denso modesto y un componente granular abundante (Figura 15 A), en contraste con la estructura nucleolar humana (Figura 15 B), están ausentes los centros fibrilares (López-Velázquez, et al., 2005; Ogbadoyi, et al., 1999). Este tipo de arquitectura bipartita sugiere que en el componente fibrilar ocurre la transcripción del rDNA y el procesamiento temprano del precursor de rRNA policistrónico mientras que, en el componente granular se realiza la modificación tardía y el ensamblaje de todos los módulos de rRNA maduro con las proteínas ribosomales y con el rRNA 5S (sintetizado por la RNA pol III) en las dos subunidades ribosomales.

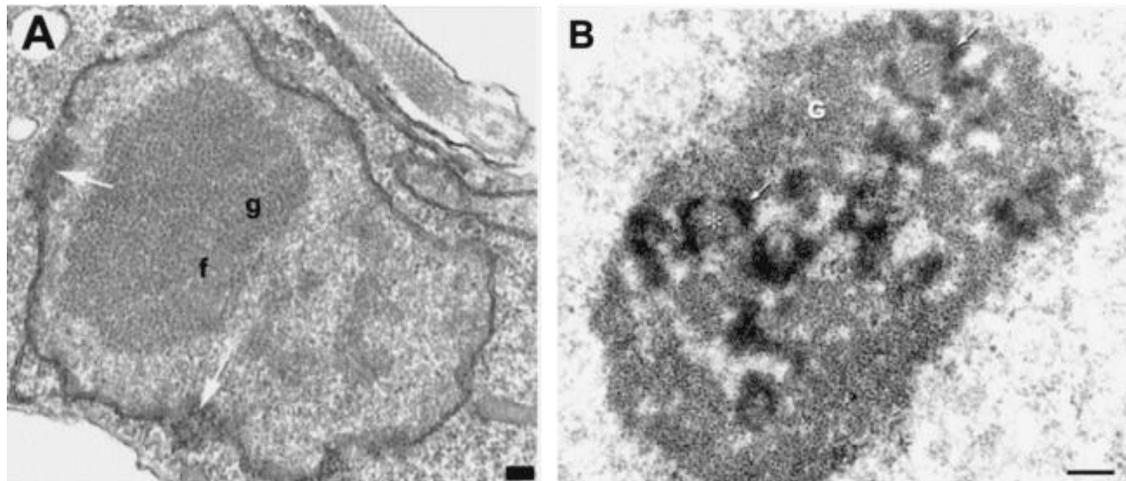


Figura 15. El nucléolo. A) Micrografía electrónica de transmisión de una sección transversa del núcleo en interfase de *T. brucei*. El cuerpo nuclear más prominente es el nucléolo, organelo bipartita que contiene un componente granular (g) y uno fibrilar (f). Barra= 0.1 μm . Imagen tomada de Ogbadoyi, *et al.*, 1999. B) Micrografía electrónica de transmisión que muestra la organización tripartita del nucléolo de células HeLa. Los centros fibrilares se señalan con un *, dos componentes fibrilares densos (DFC) son indicados con la flecha blanca. Ambos elementos están embebidos en el componente granular (G). Barra= 0.3 μm . Micrografía tomada de Hernández-Verdun, 2006.

snoRNPs y la maduración del rRNA

En eucariotas modelo, la transcripción del rDNA por la RNA pol I en el nucléolo produce un precursor policistrónico largo formado por los rRNAs 18S, 5.8S y 28S, por dos espaciadores transcritos internos (ITS) y por dos espaciadores transcritos externos (ETS) que flanquean los extremos 5' y 3'. Para obtener las especies de rRNA individuales y maduras, el transcrito primario experimenta una serie de digestiones endo y exonucleolíticas catalizadas por una colección amplia de enzimas y por algunas partículas ribonucleoproteicas nucleolares pequeñas (snoRNPs) (Tomecki, *et al.*, 2017). Como parte del proceso de maduración, decenas de nucleótidos del rRNA son metilados por snoRNPs de la clase caja C/D y residuos específicos de uridina son convertidos a pseudouridina por snoRNPs con caja H/ACA (Watkins & Bohnsack, 2012). Los snoRNPs resultan de la asociación estrecha entre un RNA nucleolar pequeño (snoRNA), guía, no codificante, que posee elementos de secuencia característicos (cajas C/D o H/ACA) con un elenco particular de cuatro proteínas nucleolares evolutivamente conservadas que incluye la enzima responsable de la reacción química que modifica el rRNA. En la isomerización de uridinas participan Nop10, Gar1, Nhp2 y Cbf5, la sintasa de pseudouridinas. En la metilación del hidroxilo 2' de la ribosa están involucradas Snu13 (15.5k en levadura), Nop56, Nop58 y la metil transferasa fibrilarina (Figura 16) (Ojha, *et al.*, 2020). En tripanosomátidos la generación del rRNA maduro es un proceso más complejo que requiere la eliminación de siete ITS, dos ETS y la modificación química de numerosos residuos en el rRNA. Estos organismos ancestrales poseen decenas de snoRNAs caja C/D y caja H/ACA (algunos son específicos de esta familia de microorganismos), la mayoría están organizados en grupos policistrónicos transcritos por la RNA pol II. Debido a la presencia de genes ribosomales con la región codificante del rRNA 28S fragmentada, se ha descrito en *T. brucei* que al menos 18 snoRNAs particulares pueden participar en el procesamiento del pre-rRNA, entre otros relevantes U3, snR30 (U17), y MRP snoRNA. Dentro del genoma de los tripanosomátidos están incluidos los ortólogos

de las cuatro moléculas canónicas que forman el *core* proteico de cada clase de snoRNPs (Eliaz, *et al.*, 2015; Liang, *et al.*, 2005). Por herramientas bioinformáticas se logró identificar a los componentes integrales de snoRNPs H/ACA, la pseudouridina sintasa Cbf5, Nhp2, Nop10 y Gar1. Con respecto a los snoRNPs cajas C/D, se localizaron la metil transferasa fibrilarina, Snu13, Nop58 y Nop56 (revisado en Martínez-Calvillo, *et al.*, 2019).

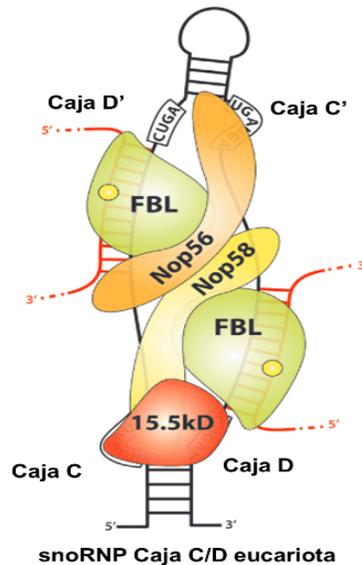


Figura 16. Representación esquemática de un típico snoRNP caja C/D de eucariotas. En la base se observa el snoRNA, en el que son ilustradas las cajas C, C', D y D'. Las interacciones proteicas entre los cuatro miembros del *core* son distinguibles. Fibrilarina es la enzima que cataliza la metilación del rRNA. Figura tomada de Gray, 2015.

Proteína nucleolar 56

En eucariotas y Arquea, la gran mayoría de las 2'-O-metilribosas son producidas por snoRNPs cajas C/D. Estas partículas poseen elementos de secuencia que son complementarios con algunas secciones del pre-rRNA que estarán sujetas a procesamiento postranscripcional. La formación del híbrido snoRNP-transcrito primario posiciona, en el sitio apropiado, al complejo enzimático responsable de la metilación del ribonucleótido blanco (Kiss-László, *et al.*, 1996) o del corte endonucleolítico que ocurre en secuencias específicas del pre-rRNA (Gautier, *et al.*,

1997). En el correcto ensamble, estabilidad y funcionamiento de las snoRNPs caja C/D, la proteína nucleolar 56 (Nop56) juega un rol fundamental. Se ha descrito que Nop56 actúa como un andamio molecular que interactúa con todos los miembros del *core* proteico asociado con esta familia de snoRNPs, lo que facilita la edición del pre-rRNA. En este contexto, se ha sugerido que fibrilarina (la metil-transferasa) solamente es activa si está en contacto directo con otros componentes del *core* (Aittaleb, *et al.*, 2003). En Arqueas, el heterodímero fibrilarina-Nop5 (proteína homóloga de Nop56 y Nop58) es suficiente para la metilación *in vitro* de los rRNA 18S y 23S aún en ausencia de un snoRNA guía (Tomkuviene, *et al.*, 2017). Además, análisis genéticos realizados en levaduras mutantes de Nop56 indicaron que el procesamiento del pre-rRNA 35S en los sitios A₀, A₁ y A₂ no se realiza adecuadamente (Gautier, *et al.*, 1997). Nop56 es un factor ancestral que se conservó durante la evolución, pues ha sido descrita desde las Arqueas y está presente en una gran diversidad de organismos del linaje eucariota (Newman, *et al.*, 2000), incluidos por supuesto, los tripanosomátidos (Ivens, *et al.*, 2005; TritrypDB). En el genoma de *L. major*, Nop56 (LmNop56) está codificada como un gen de copia única (ID: LmjF.10.0210) de 1,422 pares de bases que se localiza en el cromosoma 10. Su expresión genera una proteína de 473 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 53 kDa y un punto isoeléctrico estimado de 8.78. Como en los ortólogos de otras células eucariotas, LmNop56 está estructurada por los tres dominios funcionales típicos (Figura 17); como parte de la secuencia del amino terminal se encuentra el dominio NOP5NT que es útil para formar heterodímeros con fibrilarina. En la porción central está el motivo NOSIC, necesario para generar heterodímeros con la proteína nucleolar 58. Por último, a través del dominio Nop, LmNop56 interactúa con Snu13 unida a un snoRNA C/D guía (Gagnon, *et al.*, 2012; Nepomuceno-Mejía, *et al.*, 2018). Adicionalmente, el modelaje por homología de secuencias sugiere que LmNop56 adopta un arreglo tridimensional análogo a la estructura cristalográfica de la Nop56 de *Saccharomyces cerevisiae* con quien comparte un porcentaje de identidad cercano al 48% (Nepomuceno-Mejía, *et al.*, 2018). En promastigotes de *L. major*, en tripomastigotes de *T. brucei* y en epimastigotes de *T. cruzi*, Nop56 se concentra exclusivamente en una región del

nucleoplasma que se tiñe débilmente con moléculas fluorescentes que se intercalan en el DNA, presumiblemente la región organizadora del nucléolo (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2019). La co-localización de LmNop56 con LmElp3b (un factor nucleolar) (Nepomuceno-Mejía, *et al.*, 2018) y con los genes del rRNA 18S (Moreno-Campos, *et al.*, 2016) confirman que LmNop56 es de naturaleza nucleolar.

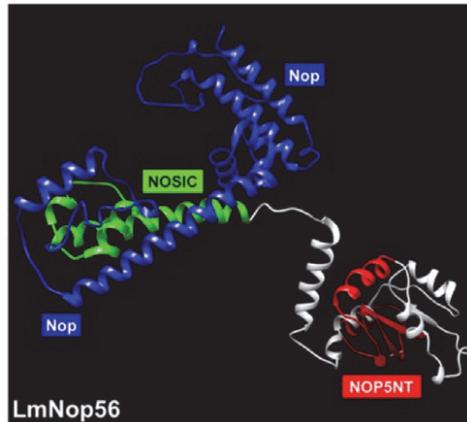


Figura 17. LmNop56. Simulación computacional de la estructura tridimensional de Nop56 de *L. major* (residuos del 8 al 421). La predicción 3D se obtuvo utilizando el software UCSF Chimera y como templado el modelo SWISS-MODEL ID:5wyj.3.A de levadura. Figura tomada de Nepomuceno-Mejía, *et al.*, 2018.

Antecedentes

En nuestro laboratorio existe interés en estudiar la biología del nucléolo de *L. major* por lo que hemos iniciado la caracterización de la proteína Nop56 de promastigotes en cultivo. En un trabajo previo de nuestro grupo se encontró que LmNop56 conserva las particularidades típicas que están presentes en otros ortólogos (elevado porcentaje de identidad de secuencia primaria, conservación de dominios funcionales, estructura secundaria y terciaria similares). Durante la interfase y la mitosis cerrada de promastigotes, LmNop56 se concentra y permanece en el nucléolo (Nepomuceno-Mejía, et al., 2018). En conjunto, estas observaciones nos sugirieron que LmNop56 puede participar activamente en la maduración del pre-rRNA en promastigotes procíclicos de *L. major*. Es necesario recordar que en estos organismos la biogénesis de las dos subunidades ribosomales parece ser un proceso complejo debido a la presencia del gen rRNA 28S dividido en varias secciones independientes. Por lo tanto, resultaba necesario dirigir los esfuerzos hacia la descripción de las moléculas con las que LmNop56 interactúa *in vivo*. En este trabajo se generaron y caracterizaron líneas celulares que expresan una versión recombinante de LmNop56 que tiene como característica principal una etiqueta conocida como PTP. Esta “bandera” molecular ha sido empleada para la purificación de complejos proteicos en los parásitos *T. brucei* (Schimanski et al., 2005) y *L. major* (Florencio-Martínez et al., 2021). La etiqueta **PTP** está formada por un epítipo de la proteína C humana (**P**rot C), un sitio de corte para la proteasa del virus del tabaco (**T**EV) y dos secuencias adyacentes de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (**P**rot A). Mediante el uso de metodologías de Biología molecular, la bandera PTP es fusionada, generalmente, en el extremo carboxilo de proteínas que son de nuestro interés investigar. Utilizando este anzuelo proteico PTP y realizando ensayos de cromatografía de afinidad en tándem acoplados con espectrometría de masas y análisis *in silico*, se ha logrado el aislamiento y la descripción de un número grande de proteínas que participan en diversos procesos

celulares de algunos tripanosomátidos (Schimanski et al., 2005; Florencio-Martínez et al., 2021).

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar una línea celular transgénica de *Leishmania major* que expresa la proteína recombinante LmNop56-PTP.

Objetivos particulares

- Analizar por medios bioinformáticos a LmNop56.
- Generar poblaciones estables que expresen LmNop56-PTP.
- Obtener las líneas celulares LmNop56-PTP
- Evaluar la expresión de LmNop56-PTP.
- Determinar la localización subcelular de LmNop56-PTP.
- Conocer la identidad de las proteínas que interactúan con LmNop56-PTP.

Metodología

Análisis in silico y modelaje tridimensional de LmNop56

Las secuencias de aminoácidos de Nop56 de *L. major*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *T. cruzi*, *T. brucei* y *T. vivax* fueron tomadas de TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Las secuencias de los ortólogos de Nop56 de humano y de levadura fueron tomadas de UniProt (uniprot.org) y SGD (yeastgenome.org), respectivamente. Para la comparación de estas secuencias, se obtuvo el alineamiento con el programa Clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), los residuos idénticos y los dominios se marcaron manualmente. La figura tridimensional se generó con el programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), usando como modelo la estructura de *Saccharomyces cerevisiae* (SWISS-MODEL Template Library ID: 6zqc.30). El score o porcentaje de similitud entre las estructuras 3D de Nop56 de *L. major* y de *S. cerevisiae* fue determinado utilizando la página electrónica ModEval (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/evaluation/>). La identidad de las proteínas que co-purificaron con LmNop56-PTP fue determinada utilizando la base de datos del genoma de *L. major* (TritrypDB)

Cultivo de promastigotes

Promastigotes wild type (WT) de *L. major* cepa Friedlin fueron cultivados axénicamente en medio líquido BM (medio M199 0.5x bicarbonato de sodio 1.1 g/l, infusión de cerebro-corazón 0.25x, HEPES 40 mM, hemina 0.01 mg/ml, biotina 2 mg/l, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 0.1 mg/ml) complementado con suero fetal bovino al 10% como se reporta en (Nepomuceno-Mejía *et al.*, 2018). Los parásitos se mantuvieron en agitación constante, a 28°C hasta alcanzar la fase media logarítmica. La línea transgénica LmNop56-PTP fue cultivada en medio BM fresco que contenía 50 μ g/ml del fármaco de selección G-418. Las células permanecieron en crecimiento exponencial al inocular 5×10^6 parásitos/ml en medio BM nuevo cada 24 horas. El conteo de parásitos se realizó en una cámara Neubauer utilizando 10 μ l de una solución que contenía promastigotes tratados con formaldehído al 2%

(dilución 1:10). La densidad poblacional se determinó bajo el microscopio óptico utilizando el objetivo 40X.

Amplificación de LmNop56 por PCR

Se diseñaron un par de oligonucleótidos para amplificar, por la reacción en cadena de la polimerasa, el gen de la proteína LmNop56 (ID: LmjF.10.0210) excluyendo el codón de paro de la traducción. Dentro de la secuencia del cebador sentido, se incluyó el sitio de corte para la enzima *Xma*I (CCCGGG) y en el antisentido para la endonucleasa *Xba*I (TCTAGA). El primer oligonucleótido fue LmNop56 *Xma*I F (5'-ACC CGG GAT GTC GAG AAC GCT GT-3') y el segundo LmNop56 *Xba*I R (5'-TCT AGA CCC GGG ACT CAG AGG CGG C-3'). Las reacciones se realizaron en el termociclador T100 de BioRad utilizando 100 ng de DNA genómico de *L. major* silvestre, dNTPs (10 mM), los dos oligonucleótidos (10 µM), la Taq polimerasa Pfx Platinum 1U y buffer de reacción pfx 1X (Invitrogen). Las condiciones de PCR fueron: a) desnaturalización inicial 95°C por 5 minutos; b) 30 ciclos de: I) desnaturalización (95°C por 30 seg), II) alineamiento (58°C a 60°C por 30 seg) y III) extensión (72°C por 1 minutos) y; c) extensión final de 72°C por 7 minutos.

Generación del vector pGe-LmNop56

El producto de PCR (LmNop56) fue precipitado con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M a -70°C durante 1 hora. Después fue centrifugado por 15 minutos a 13,000 rpm y la pastilla resultante se resuspendió en agua bidestilada para ser fraccionada por electroforesis en geles de agarosa. La banda correspondiente al gen de LmNop56 (1,431 pb) fue purificada usando el kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up extract II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. LmNop56 purificado se adeniló con 1U de Taq polimerasa (Kapa biosystems), buffer A Kapa Taq 1X, 1 µL de dATP (2 mM) por 30 minutos a 70°C. Finalmente, 50ng del gen LmNop56 adenilado fue ligado con 50 ng del vector pGEM-T Easy (Promega) empleando 1U de enzima T4 ligasa y buffer de ligación T4 1X (Promega) a temperatura ambiente por 30 minutos y posteriormente toda la noche a 4°C.

Transformación bacteriana y purificación del plásmido pGe-LmNop56

Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* cepa JM109 de alta eficiencia (Promega) con la construcción pGe-LmNop56 atendiendo el protocolo del fabricante. Los microorganismos transformados fueron sembrados en medio LB sólido suplementado con 100 µl de IPTG (100 mM), 20 µl de X-gal (50 mg/ml) y ampicilina (100 µg/ml). Las placas inoculadas se mantuvieron a 37°C toda la noche. Tres colonias blancas (elegidas al azar) fueron transferidas a medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37°C con agitación de 200 rpm durante una noche. El plásmido pGe-LmNop56, replicado por las bacterias, fue recuperado con el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel). Las tres construcciones purificadas fueron analizadas por secuenciación de DNA y por digestión con las enzimas de restricción *Xba*I y *Xma*I.

Generación del vector pNop56-PTP

Los plásmidos pGe-LmNop56 y pB6-PTP fueron tratados con las enzimas de restricción *Xba*I y *Xma*I para liberar el inserto LmNop56 (1,431 pb) y el cuerpo del vector PTP (6.67 Kpb). Al término de la reacción, los DNAs fueron separados por electroforesis en geles de agarosa y recuperados con el Kit NucleoSpin gel and PCR Clean Up (Macherey Nagel). La subclonación se realizó empleando 180 ng de LmNop56 con 100 ng del cuerpo del plásmido PTP, utilizando la enzima T4 ligasa en las condiciones arriba descritas.

Transformación bacteriana y purificación de vector pNop56-PTP

La construcción resultante pNop56-PTP se usó para transformar *E. coli* cepa DH5αE (Invitrogen), para esto se colocaron las bacterias mezcladas con 100 ng del plásmido pNop56-PTP en celdas de electroporación de 1 mm (EMC Electro Cell Manipulator BTX) y fueron sometidas a un micropulso de 2000 volts, 25 ohms y 25 µF con el electroporador ECM Electro Cell Manipulator 630 (BTX). Para identificar las células que incorporaron el vector pNop56-PTP, se inocularon en LB agar con ampicilina (100 µg/ml). Se tomaron cuatro colonias a las cuales se les extrajo el DNA plasmídico que se sometió a un análisis de restricción con las enzimas *Xba*I y *Xma*I. Finalmente, los plásmidos resultantes se secuenciaron para así descartar

errores en la secuencia y verificar que LmNop56 estuviera en marco de lectura correcto con la bandera PTP. Posteriormente, una de las clonas fue inoculada en 500 ml de medio LB complementado con ampicilina (100 µg/ml), incubada a 37°C toda la noche en agitación. El plásmido pNop56-PTP se recuperó con el kit Nucleobond Xtra Midi Plus (Macherey Nagel). Este DNA fue verificado nuevamente por digestión con las enzimas mencionadas y electroforesis en geles de agarosa. Esta construcción fue empleada para electroporar promastigotes de *L. major*.

Transfección de promastigotes de L. major

De un cultivo axénico de promastigotes de *L. major* en franca fase media logarítmica (20-25 x 10⁶ células/ml) se cosecharon 1 x 10⁸ parásitos, se lavaron con PBS-G (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, sacarosa 6 mM) y la pastilla resultante fue resuspendida en buffer cytomix (HEPES 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄/ KH₂PO₄ 10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM). Las células fueron transferidas a una celda de electroporación de 4 mm (Electroporation Cuvettes Plus™, BTX®) a la cual, se le agregaron 25 µg del vector pNop56-PTP, se incubó en hielo y enseguida fueron electroporados (EMC Electro Cell Manipulator BTX) con un pulso eléctrico de 1600V, 25 ohms y 50 µF. Los parásitos transfectados se incubaron a 28°C toda la noche en tubos cónicos de 50 ml con 10 ml de medio BM sin fármaco de selección. El G418 (Sigma) fue agregado gradualmente hasta alcanzar 50 µg/ml. Los cultivos fueron monitoreados hasta la aparición de poblaciones transgénicas estables.

Obtención de clonas celulares LmNop56-PTP

De las poblaciones resultantes se realizaron diluciones seriadas para obtener 100, 250, 500, 1000 y 2000 promastigotes transgénicos. Estos parásitos fueron depositados en medio de cultivo BM semisólido que contenía agarosa al 8% (SeaPlaque GTG, Cambrex), suero fetal bovino al 20% y G418 50 µg/ml. Las células se incubaron a 28°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Seis colonias fueron seleccionadas, transferidas a cajas de cultivo de 25 ml con medio BM con el fármaco de selección y se mantuvieron a 28°C con agitación suave.

Obtención de la proteína total de promastigotes

Promastigotes silvestres y transgénicos (LmNop56-PTP) fueron cosechados y tratados por dos metodologías diferentes para obtener los extractos proteicos totales. La primera extracción se hizo por la técnica de buffer RIPA. Los parásitos se lavaron dos veces con PBS y fueron empastillados por centrifugación (5000 rpm durante 10 minutos.). La pastilla celular se resuspendió en el buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, Deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, inhibidores de proteasas 1X) utilizando 100 µl de buffer RIPA por cada 50 millones de promastigotes cosechados. La mezcla se conservó a 4°C por 30 minutos, mezclando vigorosamente cada cinco minutos. Después de centrifugar (14,000 rpm, 20 minutos, 4°C), el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -70°C hasta su uso. La segunda metodología empleada fue la extracción por lisis con calor. Las células obtenidas de la fase media logarítmica fueron cosechadas tras ser resembradas tres días consecutivos. Los promastigotes se lavaron dos veces con PBS y se empastillaron centrifugando a 5000 rpm durante 10 minutos. La pastilla se resuspendió en buffer Laemmli 2X (Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, Glicerol 20%, SDS 4%, 2-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004%) empleando 1 µl de Buffer Laemmli por cada millón de células cosechadas. Los parásitos fueron lisados en agua en ebullición durante 10 minutos. La suspensión fue almacenada a -70°C hasta su uso.

Electroforesis en gel de acrilamida

Los extractos proteicos se desnaturalizaron con solución Laemmli 2X y posteriormente, fueron fraccionados por electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El gel de acrilamida consta de dos partes: a) un gel concentrador (acrilamida al 4% en Tris-HCl 133 mM pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1%, TEMED 0.2%) y, b) un gel separador (acrilamida al 10% en Tris-HCl 374 mM, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y TEMED 0.2%). La electroforesis se realiza empleando una solución de corrida (Tris 24 mM, glicina 191 mM, SDS 0.1%) a 70 volts durante 30 minutos y después a 100 volts durante 90 minutos. La integridad del extracto proteico fue verificada por la tinción del gel con el reactivo azul de Coomassie.

Western blot

La expresión de la proteína recombinante LmNop56-PTP fue determinada por ensayos tipo Western blot. Para ello, extractos proteicos obtenidos de parásitos silvestres y de la línea LmNop56-PTP lisados con buffer RIPA o con fuego se fraccionaron por SDS-PAGE. Después, las proteínas fueron transferidas, por electricidad, a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) sumergida en buffer de transferencia 1X (25 mM Tris base, 192 mM Glicina, 20% metanol, pH 8.3) a 100 volts durante 90 minutos a 4°C. Posteriormente, los sitios de unión no específicos se bloquearon empleando una solución al 5% de leche (BioRad) o de albúmina sérica bovina (BSA; Roche) en PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T). Las membranas se incubaron de manera separada con alguno de los siguientes anticuerpos primarios: a) α -proteína A (Sigma) (dilución 1:3000); b) α -proteína C (Delta biolabs) (1:3000); c) α -FLAG (Sigma) (1:1500) y d) suero policlonal α -LmNop56 hecho en ratón 1:1000 (Nepomuceno-Mejía, *et al.*, 2018). Después de lavados exhaustivos con PBS-T, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa de rábano (*BioLegend*). Los inmunocomplejos formados fueron puestos de manifiesto por una reacción quimioluminiscente con el Kit Immobilion™ Western (Millipore).

Inmunofluorescencia indirecta

La localización subcelular de LmNop56-PTP fue determinada por ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Parásitos de la línea celular LmNop56-PTP de fase media logarítmica fueron lavados con PBS y adheridos en portaobjetos tratados con una solución de poli L-lisina (0.1%). Después, las células se colocaron en una cámara húmeda y se fijaron con 4% de paraformaldehído en PBS durante 30 minutos a 4°C. Se realizaron tres lavados con PBS-T durante 10 minutos. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.1% (Sigma) por 5 minutos. Los sitios inespecíficos de unión fueron bloqueados con BSA al 2% en PBS durante 30 minutos en cámara húmeda. Los promastigotes fueron tratados con una solución que contenía los anticuerpos primarios: a) anti-Nop56 1:100; b) anti-prot C 1:50; c) anti-prot A 1:500 o d) anti-Flag 1:100. El tiempo de interacción fue de 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBS-frío, las células

interaccionaron, durante una hora, con los anticuerpos secundarios anti IgG de ratón y/o anti IgG de conejo (BioLegend) acoplados a los fluoróforos Alexa Fluor 568 (señal roja) o Alexa Fluor 488 (señal verde), respectivamente. Después de retirar el exceso de anticuerpo secundario, se agregó el medio de montaje VectaShield con DAPI (Vector Labs). Finalmente, las preparaciones celulares fueron analizadas por microscopía de epifluorescencia y confocal. Para su presentación final, las imágenes fueron preparadas en el programa ZEN 2012 software (Blue edition).

Purificación por cromatografía de afinidad en tándem

Preparación de extractos

Parásitos de la línea celular LmNop56-PTP fueron crecidos en 3 litros de medio BM con 50 µg/ml de G418 hasta que llegaron a la fase media logarítmica con una concentración de 25-40 x 10⁶ cel/ml. Posteriormente, fueron centrifugadas a 4500 rpm a 4°C por 10 minutos. Se retiró todo el medio de la pastilla y se lavó con 200 ml de PBS-G. Posteriormente se resuspendió en 40 ml de buffer PBS-G. La lisis celular se realizó con 12 ml de buffer IPP-150 frío (Tris-HCl 10mM pH 8.1, NaCl 150mM, NP-40 0.1%) con inhibidores de proteasas 2.5X, se homogeneizó por inversión y se agregaron 3.5 ml de Triton X-100 al 10%. La suspensión se mantuvo en hielo durante 30 minutos y las células se lisaron completamente con un homogeinizador Dounce. Finalmente se centrifugó a 10,000rpm, 4°C por 15 minutos.

Cromatografía de afinidad IgG

A una columna de 20 ml Econo-Pac (BioRad) se le adicionaron 10 ml de IPP-150 y 350 µl de perlas de sefarosa IgG (Amersham), se dejó incubar a 4°C por 5 minutos y el líquido se drenó por gravedad. Después, se agregó el lisado celular (aproximadamente 20 ml) a la columna que se mantuvo en rotación suave por 3 horas a 4°C. Al finalizar el tiempo, por gravedad se desecharon los componentes que no se unieron a la IgG. Posteriormente, los extractos fueron incubados con 100 U de la proteasa TEV (Sigma Aldrich) y se permitió la digestión a 4°C durante la noche en rotación constante. Al siguiente día, se eluyeron los complejos proteicos y se mezclaron con solución PC-150 (Tris-HCl 20 mM pH 7.7, KCl 150 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 0.1%, CaCl₂ 0.5 mM e inhibidores de proteasas 1X.

Purificación por afinidad con la resina α -Proteína C

Esta suspensión se depositó en una columna Econo-Pac (BioRad) de 5 ml prellenada con 300 μ l de una matriz de afinidad α -Proteína C (“HPC4”, Roche). La interacción se realizó durante 3 horas a 4°C con rotación suave. Se drenó lo no unido a prot C, se lavó la columna con PC-150 y se recuperaron los complejos proteicos haciendo cinco eluciones de 300 μ l con buffer de elución (Tris-HCl 5 mM pH 7.7, EGTA 10 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas al 1X). Las proteínas purificadas fueron concentradas en columnas Amicon® Ultracel 3K (Millipore) de 0.5 ml centrifugando a 12,000 g durante 180 minutos y, una pequeña fracción fue analizada en SDS-PAGE teñido con SYPRO-ruby (Molecular Probes). El extracto proteico restante fue concentrado en gel de acrilamida y enviado al servicio de Proteómica y Espectrometría de masas de la Upstate Medical University para la identificación de las proteínas que interaccionan con LmNop56 *in vivo*.

Resultados

Análisis in silico de LmNop56

Nop56 es una proteína esencial que está presente en organismos procariotas y eucariotas. En *L. major* está compuesta por 473 aminoácidos (aa) y presenta los tres dominios funcionales típicos que han sido descritos en una diversidad de organismos (Nepomuceno-Mejía, *et al.*, 2018). Para determinar el nivel de conservación de Nop56 dentro del género *Leishmania*, fueron comparadas las secuencias de aa de los ortólogos presentes en especies representativas de los subgéneros *Leishmania* (*L. major* LmjF.10.0210, *L. mexicana* LmxM.10.0210.), *Viannia* (*L. braziliensis* LBRM2903_100007100) y *Mundinia* (*L. enriettii* LENLEM3045_100007600). Los datos obtenidos nos indicaron que las Nop56 de estos parásitos son similares en cuanto al número de aa que la componen (471-474 aa) y a su masa molecular predicha (un poco más de 52 kDa). Además, el alineamiento múltiple de la secuencia primaria demostró que la proteína Nop56 está altamente conservada en el género *Leishmania* (Figura 18). Fueron obtenidos porcentajes de identidad superiores al 94% entre los diferentes ortólogos de las especies que incluimos en este trabajo (Tabla 1). Este elevado grado de conservación se resalta con cajas de color verde en la figura 18. De manera adicional, algunos residuos semiconservados son ilustrados en cajas de color azul (Figura 18).

	Lb	Le	Lm	Lme
Lb	100	94.48	94.26	94.27
Le		100	94.50	94.94
Lm			100	97.89
Lme				100

Tabla 1. Porcentajes de identidad de los ortólogos de Nop56 en *L. braziliensis* (Lb), *L. enriettii* (Le), *L. major* (Lm) y *L. mexicana* (Lme). Como ejemplo, Nop56 de *L. major* es 97.89% idéntica al ortólogo presente en *L. mexicana*. Los porcentajes fueron obtenidos en la página Web de Clustal Omega.

Lb	MSKTLYALYESPTGYAIFKIRRTTEEI GAENVV LQKTLQDFSTFSPWVKLVSFAPFESPEN	60
Le	MSKTLYTLYEAPTGYAIFKIRRTTEEI GAEDVALQKELQDFSTFSPWVKLVSFAPFESPEN	60
Lm	MSRTLYTLYEAPTGYAIFKVRTTEEI GAEDVALQKELQRFSTFSPWVKLVSFAPFESPEN	60
Lme	MSRTLYTLYEAPTGYAIFKVRTTEEI GAEDVALQKELQSFSTFSPWVKLVSFAPFESPEN	60
Lb	ALEDAVCI SENLISAF LSNFLTAAFAKKVAKDEANWELGVQDPKLGSAIHDELNIPVLCN	120
Le	ALEDAVCI SENLIS TFLNNFLTAAFAKKVAKAEANWELGVQDPKLGSAIHDELNIPVLCN	120
Lm	ALEDAVCI SENLMSTFLNNFLTAAFAKKVAKNEANWELGVQDPKLGSAIHDELNIPVLCN	120
Lme	ALEDAVCI SENLIS TFLNNFLTAAFAKKVAKSEANWELGVQDPKLGSAIHDELNIPVLCN	120
Lb	ENVAEI SRCIRLHAEKLLPEHNEGDV PRAQCGLGHAFSRNKVKFNVHRSDNMIIQASALM	180
Le	ESVAEISRCIRLHAEKLLPEHNEGDV PRAQCGLGHAFSRNKVKFNVHRSDNMIIQASALM	180
Lm	ETVAEISRCIRLHAEKLLPEHNEGDV PRAQCGLGHAFSRNKVKFNVHRSDNMIIQASALM	180
Lme	ETVAEISRCIRLHAEKLLPEHNVGDV PRAQCGLGHAFSRNKVKFNVHRSDNMIIQASALM	180
Lb	EHMDKGVNLLGMRVKEWYGWHFPELAKEVPEPLKYANVALLIGNRGSLEEAPEDDKARI	240
Le	EHMDKGVNLLGMRVKEWYGWHFPELAKEVPEPLKYANVALLIGSRSSLEEAL EEDVKSRI	240
Lm	EHMDKGVNLLGMRVKEWYGWHFPELAKEVPEPLKYANVALLIGNRNSLEEAP EEDVKAQL	240
Lme	EHMDKGVNLLGMRVKEWYGWHFPELAKEVPEPLKYANVALLIGNRNSLEEAP EEDVKAQL	240
Lb	CDILEGDEALAARVYEKAVTSMGGDMAEVDWDCI RTFAKRVASLGQYRVALAQYLVDKMM	300
Le	SDILEGDEALAARVYEKAVTSMGGDMAEVDWDCI RTFAKRVASLGQYRVALAQYLVDKMM	300
Lm	CDILEGDEALAARVYEKAVTSMGGDMAEVDWDCI RTFAKRVASLGQYRVALAQYLVDKMM	300
Lme	CDILEGDEALAARVYEKAVTSMGGDMAEVDWDCI RTFAKRVASLGQYRVALAQYLVDKMM	300
Lb	LVAPNLTQLMGQTI GAKLISKAGSLTNLAKSPASTIQILGAEKALFRALKKKKGNTPKYG	360
Le	LVAPNLTQLMGQTI GAKLISKAGSLTNLAKSPASTIQILGAEKALFRALKKKKGNTPKYG	360
Lm	LVAPNLTQLMGQTI GAKLISKAGSLTNLAKSPASTIQILGAEKALFRALKKKKGNTPKYG	360
Lme	LVAPNLTQLMGQTI GAKLISKAGSLTNLAKSPASTIQILGAEKALFRALKKKKGNTPKYG	360
Lb	LI FHSSFIQRASKEHRGKISRYLANKAALACRIDCFMDAPPTVFGEKLRQVEARLNF FD	420
Le	LI FHSSFIQRASKEHRGKISRYLANKAALACRIDCFMDAPPTVFGEKLRQVEARLNF FD	420
Lm	LI FHSSFIQRASKENRGKISRYLANKAALACRIDCFMDAPPTVFGEKLRQVEARLNF FD	420
Lme	LI FHSSFIQRAAKENRGKISRYLANKAALACRIDCFMDAPPTVFGEKLRQVEARLNF FD	420
Lb	TGNKPPSNKAAMAEALEQYQRI LRKRDRKHAEKDVEETPKAKKSRKVEASE---	471
Le	TGNKPPSNKAAMAEALEQYQRI LRKRDRKQAEEGAEEV PKVKKSRKIEVSSQSE	474
Lm	TGNKPPSNKAAMAEALEQYQRI LRKRNRKQANEDTEETPKKK-SRKVVAAASESG	473
Lme	TGNKPPSNKAAMAEALEQYQRI LRKRDRKQADEDAEETPKRKKSRKVVAAASESE	474

Figura 18. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Nop56 de cuatro especies de *Leishmania*; *L. braziliensis* (Lb), *L. enriettii* (Le), *L. major* (Lm) y *L. mexicana* (Lme). Los residuos conservados y semi-conservados se muestran en cajas color verde y azul, respectivamente. Las barras de colores dispuestas en la parte superior del alineamiento indican la longitud de los dominios conservados en LmNop56: en rosa está NOP5NT (residuos 5-70); en naranja está NOSIC (residuos 172-224) y en morado Nop (residuos 225-419). Los números al final de cada renglón indican el conteo de aminoácidos de la secuencia.

Posteriormente, se realizaron dos alineamientos adicionales, el primero para comparar la secuencia de LmNop56 contra el ortólogo de tres especies del género *Trypanosoma* (Figura 19) y el segundo con la proteína de humano y de levadura

(Figura 20). Al comparar el número de aminoácidos del ortólogo de Nop56 de organismos del género *Trypanosoma*; *T. brucei* (Tb927.8.3750), *T. cruzi* (TcYC6_0063000) y *T. vivax* (TvY486_0803170) contra *L. major*, se puede notar que las tres especies de *Trypanosoma* tienen aproximadamente 10 aminoácidos más en su secuencia (480-483 aa) que en LmNop56 (473 aa). Hay una diferencia en cuanto a la masa molecular, pues la secuencia de los *Trypanosomatidos* oscila entre los 53-54 kDa mientras que la masa molecular de *L. major* es de 52.68 kDa. Los datos obtenidos del alineamiento múltiple nos indican que LmNop56 y sus ortólogos de *Trypanosoma* son bastante similares. Como se observa en la figura 19, la distribución de residuos idénticos está concentrada hacia el dominio Nop (aminoácidos 225-419) y en menor grado en el resto de la proteína (Figura 19, cajas verdes). El porcentaje de identidad compartido entre este grupo de proteínas está alrededor del 80% (Figura 19 y tabla 2). En conjunto, estas observaciones nos sugieren que Nop56 se conservó de manera importante entre los miembros de la familia de los tripanosomátidos (Figura 18 y 19; tablas 1 y 2).

	Lm	Tb	Tc	Tv
Lm	100	80.51	80.17	78.56
Tb		100	86.88	85.42
Tc			100	87.03
Tv				100

Tabla 2. Matriz del porcentaje de identidad de LmNop56 comparado con otras especies de tripanosomátidos. *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc) y *T. vivax* (Tv). Los porcentajes son el resultado del análisis de las secuencias de aa mediante el uso del programa Clustal Omega.

Lm	MSRTLYTLYEAPTGYAIFKVRTTEETGAE DVALQKELQRFSTFSPVVKLVSFAPFESPEN	60
Tb	MSKTLYLLEYEGPTGYALFKVLTTEETGAGDVALQKDLQTFATFSPVVKLLSFAPYQSPEN	60
Tc	MSKTLVLYEAPTGYAVYKVLTEETGAGDVALQKDLQTFATFSPVVKLISFAPFQSPEN	60
Tv	MSKTLYLLEYEAPTGYAMYKVLKTEEVGSNDVALQNDLQNFATFSPVVKLISFAPFQSPEN	60
Lm	ALEDAVCISENIMSTFLNNFLTAAFAKVKAKNEANWELGVQDPKLGSAIHDELNIFVLCN	120
Tb	ALEDAVCINESIVSPFLNNFLTSLVLSKATKGEANWELGVSDPKLGSAIHDELKFAVLCN	120
Tc	ALEDAVCISESLVSPFLNNFLSSVLAKKAKKGDVNWELGVCDKLGSAIHDDLKFPWVCN	120
Tv	ALEDAICISESLVSPFLNNFLTSLVLAKRKAKEDVNWELGVCDTKLGSAIHDELKFPWVCN	120
Lm	ETVAEISRCIRLHAEKLLPEHNEG DVPRAQCGLGHAFSRNKVKFNVHRSDNMI IQASALM	180
Tb	ENVVEMCRCLRLHAEKLLPEHQEKDILRAQCGLGHAFSRNKVKFNVHRSDNMI IQSSALT	180
Tc	ENVVEISRC LRMHAEKLLPEHKEGDI PRAQCGLGHAFSRNKVKFNVHRSDNMI IQSSALA	180
Tv	ENVVELCRCLRLHASKLLPEHSEDDILRAQCGLGHAFSRNKVKFNVHRSDNMI IQSSALA	180
Lm	EHMDKGVNLLGMRVKEWYGWHFPELAKEVPEPLKYANVALLIGNRNSLEEAPEDVKAQL	240
Tb	EHMDKGVNLLGMRVKEWYGWHFPELAKEVPEPLKYSKVALLIGSRSTLEERDTEEVTOOI	240
Tc	EHMDKGVNLLGMRVKEWYGWHFPELAKEVPEPLKYAKVALLIGSRSTLEERDAEEVTOOI	240
Tv	EHMDKGVNLLGMRVKEWYGWHFPELAKEVPEPLKYAKVALLIGSRSTLEQRDAEEVTOOI	240
Lm	GDI LEGDEALAARVYEKAVTSMGGDMAEVDWDCIRTFAKRVASLGQYFVALAQOYLVDKMM	300
Tb	AEI LEGDEALAARVYEKAVTSMGGDMAEVDWSNIRRMKRVVSLGDYRESLQOYLVDKMM	300
Tc	ADI LEGDEALAARVYEKAVTSMGGDMAEVDWLNIRAFMERVTSLSYRESLQOYLVEKMM	300
Tv	AEI LEGDEALAARVYEKAVTSMGGDMAEVDWTNIRHFTRVVSLSYRESLQOYLVDKMM	300
Lm	LVAPNLTEIMGQTI GAKLISKAGSLTNLAKSPASTIQILGAEKALFRALKKKKGNTPKYG	360
Tb	LVAPNLTEIMGQNI GAKLISKAGSLTNLAKSPASTIQILGAEKALFRALKKRKGNTPKYG	360
Tc	LVAPNLTEIMGQNI GAKLISKAGSLTNLAKAPASTIQILGAEKALFRALKKRKGNTPKYG	360
Tv	LVAPNLTEIMGQNI GAKLISKAGSLTNLAKSPASTIQILGAEKALFRALKKRKGNTPKYG	360
Lm	LIFHSSFIQRAAKENRGKISRYLANKAALACRIDCFMDAPPVTFGEKLEQVEARLNFFD	420
Tb	LIFHSTFIQRAAKEHRGKISRYLANKAALACRIDCFMDAPPQVTFGEKLEQVEARLNFFD	420
Tc	LIFHSTFIQRAAKEHRGKISRYLANKAALACRIDCFMETPPAVTFGEKLEQVEARLNFFD	420
Tv	LIFHSSFIQRAAKEHRGKISRYLANKAALACRIDCFMDTTPPVTFGEKLEQVEARLNFFD	420
Lm	TGNKPPSNKAMAEALEQYQRTILRKRNRKQANEDTEE-----TPKPKK-SRKVVA	468
Tb	TGNKPPSNRVAMAEALEQYKKTILRRRAKKQRTAQSAEAEGER-EEVSETPKQKRSRREVP	479
Tc	TGNRPPTNMVAMAEALEQYQKTI LRKRSKROREAQSAAGNGDDEVKQEVPPKKRARRREEV	480
Tv	TGNRPSPSNRVAMAEALEQYQKTI LRRAKKQRAAEAPGDV---ETPAPASKRKKVRRVEQ	477
Lm	ASESG	473
Tb	QESA-	483
Tc	Q----	481
Tv	AAE--	480

Figura 19. Comparación de la secuencia de aminoácidos de LmNop56 con tres especies de *Trypanosoma*; *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc) y *T. vivax* (Tv). Los residuos conservados y semi-conservados se muestran en cajas color verde y azul, respectivamente. Los números al final de cada línea indican la cantidad de aminoácidos que la componen.

Como se mencionó, LmNop56 es una proteína de 473 aa y 52.7 kDa mientras que el ortólogo de Nop56 en *Homo sapiens* (O00567) está formada por 594 aa y 66 kDa. Por su parte, en *S. cerevisiae* (S000004187), Nop56 está compuesta por 504 aa con una masa molecular predicha de 56.9 kDa. Con el interés de determinar el nivel de conservación en diversos organismos del linaje eucariota, fueron alineadas las secuencias de Nop56 de estas tres especies (Figura 20) y se obtuvieron los porcentajes de identidad entre estos ortólogos (Tabla 3). El alineamiento múltiple nos muestra que la cantidad de residuos idénticos compartidos entre estas tres proteínas es de 167 aa, la mayoría están localizados en el dominio Nop (Figura 20, cajas verdes), una región altamente conservada. Los porcentajes de identidad determinados entre LmNop56 con HsNop56 y con ScNop56 son del 46.52% y 47.71%, respectivamente (Tabla 3). Es importante mencionar que algunos residuos de LmNop56 son compartidos con HsNop56 o con ScNop56 pero no con ambas, esta “semi-conservación” es resaltada en la figura 20 con cuadros azules.

	Lm	Hs	Sc
Lm	100	46.52	47.71
Hs		100	52.33
Sc			100

Tabla 3. Matriz del porcentaje de identidad de LmNop56 comparado con *H. sapiens* (Hs) y con *S. cerevisiae* (Sc). Los porcentajes son el resultado de la comparación de secuencias obtenido con el programa Clustal Omega.

Lm	MSRTLYTLYEAPTGYAIFKVRRTT-EEIGAEDVALQKELQRFSTFSPWVKLVSFAPFESPE	59
Hs	-MVLHVLFEHAVGYALLALKEV-EEISLLQPVEESVLNLGKFHSIVRLVAFCPFASSQ	58
Sc	MAPIEYLLFEPTGYAVFKVKLQDDIGSRLKEVQEQINDFGAFTKLIELVVSFAPFKGAA	60
Lm	NALEDVAVCISENI MSTFLNNFLTAAFK KVAKNEANWELGVQDPKLGSAIHDELNI-PVL	118
Hs	VALENANAVSEGVVHEDLRLLLETHLPS----K KKKVLLGVGDPKIGAAIQEELGY-NCQ	113
Sc	EALENANDISEGLVSESLKAILDLNLPKA-SSKKNITLAISDKNLGPSIKEEFPYVDCI	119
Lm	CNETVAEISRCIRLHAEKLLPEHNEGDPVRAOGLGHAFSRNKVKFNVHRSNDMMIIQASA	178
Hs	TGGVIAEILRGVRLHFHNLVKGLTDL SACKAQLGLGHSYSRAKVKFNVNRVDNMMIIQASIS	173
Sc	SNELAQDLIRGVRLHGEKLFKGLQSGDLERAQLGLGHAYSRAKVKFSVQKNDNHI IQAIA	179
Lm	LMEHMDKGVNLLGMRVKEWYGFHFPPELAKVPEPLKYANVALLIGNRNSLEEAPEDVKA	238
Hs	LLDQLDKDINTFSMRVREWYGYHFPPELVKIINDNATYCRLAQFIGNRRELNEDKLEK---	230
Sc	LLDQLDKDINTFAMRVKEWYGFHFPPELAKLVPDNYTFAKLVLFIKDKASLNDDSLHD---	236
Lm	QLGDILEGDEALAARVYEKAVTSMGGDMAEVDWDCIRTFKRVASLQGYRVALAQYLVDK	298
Hs	-LEELT-MDGAKAKAILDASRS SMGMDISAI DLINIESFSSRVVSLSEYRQSLHTYLRSK	288
Sc	-LAALLNEDSGIAQRVIDNARISMGQDISETDMENVCVFAQRVASLADYRRQLYDYLCEK	295
Lm	MMLVAPNLTQLMGQTI GAKLISKAGSLTNLAKSPASTIQILGAEKALFRALKKKKGNTPK	358
Hs	MSQVAPSLSALIGEAVGARLIAHAGSLTNLAKYPASTVQILGAEKALFRALK-TRGNTPK	347
Sc	MHTVAPNLSLIGEVIGARLISHAGSLTNLSKQAASTVQILGAEKALFRALK-TKGNTPK	354
Lm	YGLIFHSSFIQRASKENRGKISR YLANKAALACRIDCFMDAEP TVFGEKLRQVEARLNF	418
Hs	YGLIFHSTFIGRAAAKNKGRI SR YLANKCSIASRIDCFSEVPTSVFGEKLRQVEERLSF	407
Sc	YGLIYHSGFISKASAKNKGRI SR YLANKCSMASRIDNYSEEPSNVFGSVLKKQVEQRLEF	414
Lm	FDTGNKPPSNKAAMAEALEQYQRILRKRNRKQANEDTE--ETPKKSRKV-----VAAS-	470
Hs	YETGEIPRKNLDVMKEAMVQAE--AAAEITRKLEKQE--KKRLKKEKRLAALALASSE	463
Sc	YNTGKPTLKNELAIQEAMELYNKDKPAAEVEETKEKESKSRKLEDDDE-----	463
Lm	-----ESG-----	473
Hs	NSSSTPEECEEMSEKPKKKKKQKPQEV PQENGMEDPSISFSKPKKKKKSFSKEELMSSDLE	523
Sc	---EKKEKKEKSKKEKKEKKEKDKKE---KKDK--KEKKDKKKKS--KD-----	504
Lm	-----	473
Hs	ETAGSTSIPKRKKSTPKEETVNDPEEAGHRSGSKKKRKF SKEEPVSSGPPEAVGKSSSK	583
Sc	-----	504
Lm	-----	473
Hs	KKKFKKASQED	594
Sc	-----	504

Figura 20. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Nop56 de los eucariotas *L. major*, *Homo sapiens* y *S. cerevisiae*; los residuos conservados y semi-conservados se muestran con cajas de color verde y azul, respectivamente. Los números al final de cada línea indican la cantidad de aminoácidos que la componen.

Dominios conservados y estructura secundaria de Nop56

Nop56 es una proteína que se caracteriza por tener tres dominios funcionales que son referidos como NOP5NT, NOSIC y Nop. Con el fin de realizar una comparación entre LmNop56 y ScNop56 se realizó un análisis bioinformático para determinar la posición y longitud de cada dominio, así como también para identificar los elementos estructurales secundarios ensamblados en forma de hélices α y de hojas plegadas β en ambas proteínas. Los resultados obtenidos en diferentes páginas Web diseñadas para la identificación de dominios conservados son resumidos en la tabla 4 e ilustrados en la figura 21.

	<i>L. major</i>	<i>S. cerevisiae</i>
NOP5NT	5-70	6-72
NOSIC	172-224	173-225
Nop	225-419	299-417

Tabla 4. Dominios conservados de Nop56 en *L. major* y *S. cerevisiae*. Los números denotan los residuos que abarcan cada dominio. Los colores corresponden con el código de color que se usará para identificar cada motivo conservado en las figuras 21 y 22.

De manera interesante, y a pesar de que el porcentaje de identidad (a nivel de secuencia primaria) no es muy alto (47.7% tabla 3), la disposición y el número de los elementos de la estructura secundaria tienen gran similitud en la proteína de ambas especies (Figura 21). Los resultados obtenidos muestran que en LmNop56 son ensambladas 28 α -hélices y cinco laminas- β . Por su parte, ScNop56 está estructurada por 30 α -hélices y el mismo número de hojas plegadas β (Figura 21).

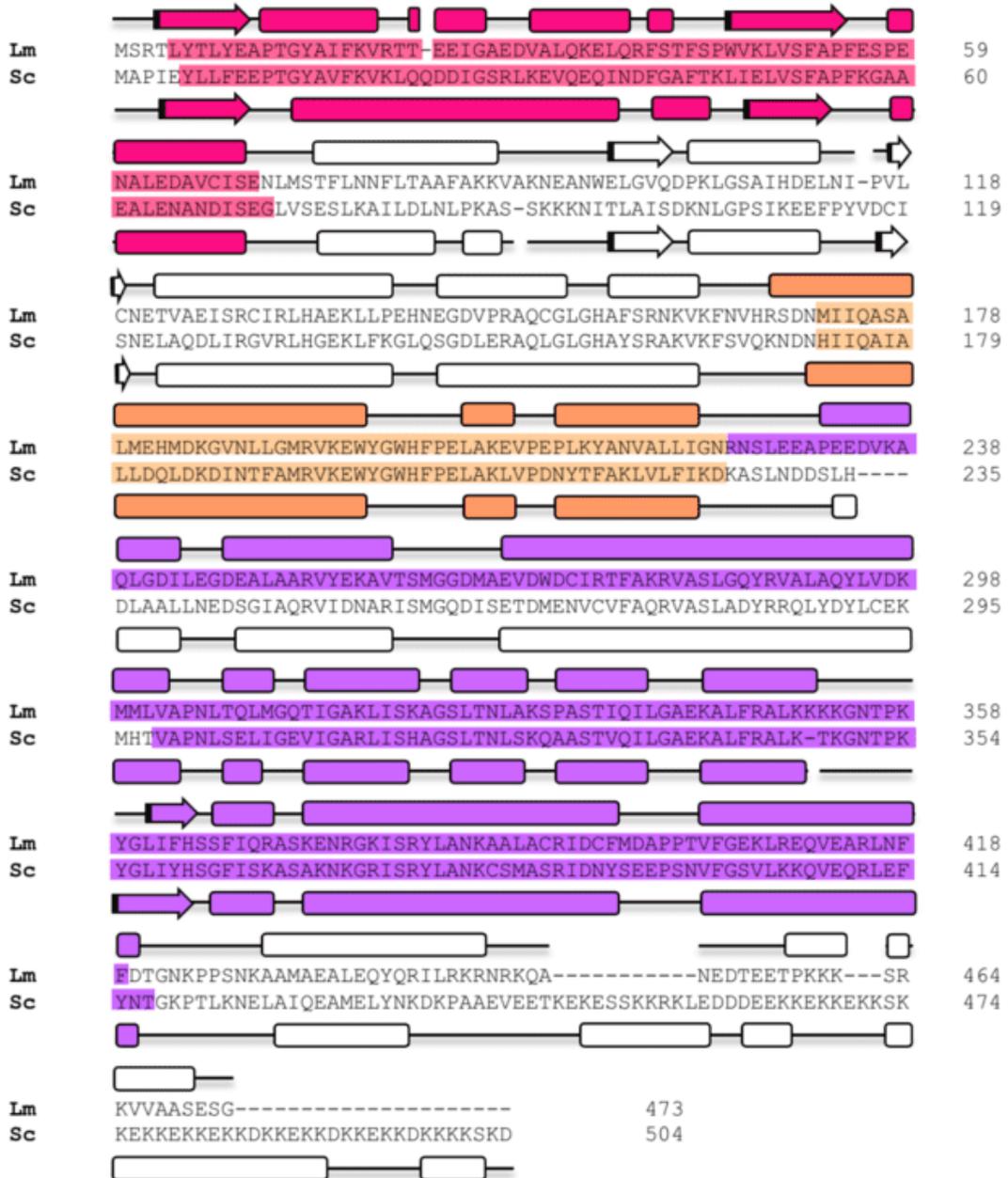


Figura 21. Estructura secundaria y dominios conservados de Nop56 de *L. major* (Lm) y *S. cerevisiae* (Sc). Las secuencias de aminoácidos se alinearon con el programa Clustal Omega. Los elementos de la estructura secundaria de LmNop56 son ilustrados en la parte superior del alineamiento, mientras que en Sc son indicados en la parte inferior. Las estructuras en blanco no pertenecen a ningún dominio que haya sido descrito hasta el momento. Los rectángulos corresponden a las α hélices mientras que las flechas a las cadenas β plegadas y poseen los colores del dominio al que pertenecen. Los tres motivos conservados están sombreados dentro de la secuencia de aa con diferente color; NOP5NT en rosa, NOSIC en naranja y Nop en morado.

Determinación *in silico* de la estructura terciaria de LmNop56

El modelaje de Nop56 de las especies *L. major*, *L. braziliensis* y *L. mexicana* fue completado usando la secuencia de aminoácidos de cada proteína (residuos 3 al 419), la página web de SWISS-MODEL, el software UCSF Chimera y como templado la estructura de *S. cerevisiae* con el número de identificación ID: 6zqc.30. Con base en los resultados obtenidos, observamos que las estructuras tridimensionales modeladas presentan un arreglo espacial altamente parecido (Figura 22). La posición de los dominios funcionales NOP5NT, NOSIC y Nop es indicada dentro del modelo 3D de *L. major* (Figura 22).

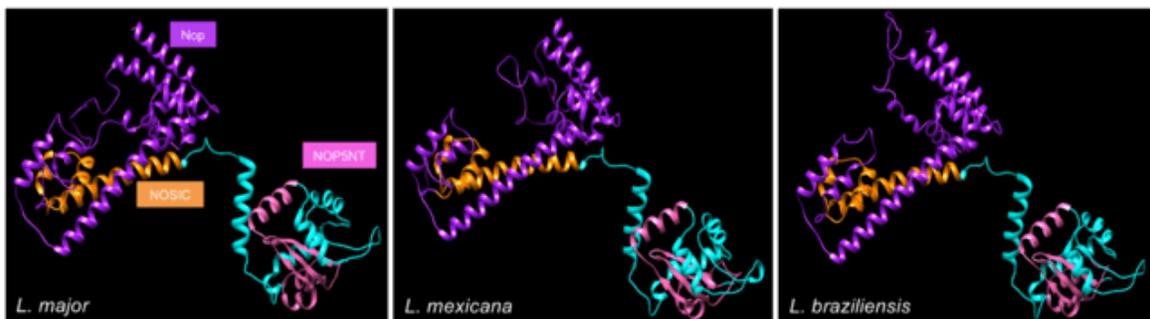


Figura 22. Estructura tridimensional de Nop56 obtenida por medios computacionales. Fueron modeladas las secuencias de aa (residuos 3 al 419) de las especies *L. major*, *L. mexicana* y *L. braziliensis*. Son señalados los tres dominios conservados (NOP5NT, NOSIC y Nop) que son indispensables para el correcto funcionamiento de la proteína.

Adicionalmente, el modelaje simultáneo de LmNop56 y de ScNop56 nos permitió percibir que las proteínas comparten una disposición tridimensional significativamente equivalente (score de similitud de 0.84). Cuando se realizó la sobreposición de ambos ortólogos, encontramos que el arreglo tridimensional de cada molécula se sobrelapa claramente en prácticamente toda la proteína (Figura 23), a pesar de que ScNop56 es 4.2 kDa (31 aa) más grande y el porcentaje de identidad de ambas proteínas es de sólo el 47.7% (Figura 21). En conjunto, los datos *in silico* nos permiten especular que LmNop56 puede desarrollar funciones semejantes a las que realizan las Nop56 de otros organismos. Por lo anterior, consideramos que LmNop56 es un candidato importante para el estudio de la biogénesis ribosomal en este eucariota ancestral.

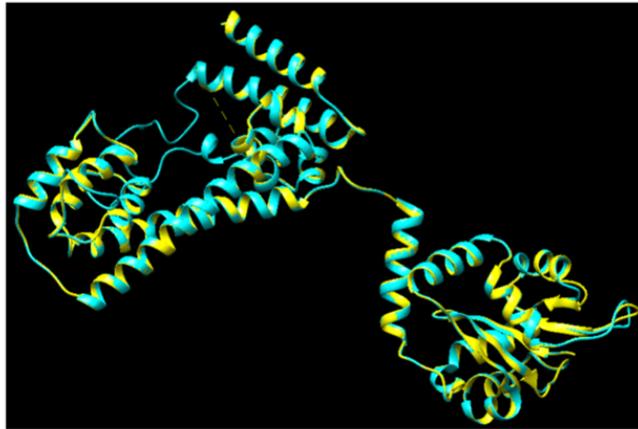


Figura 23. Modelaje computacional simultáneo y tridimensional de las secuencias de aminoácidos de Nop56 de *L. major* (azul) y *S. cerevisiae* (amarillo). La arquitectura espacial de ambas moléculas muestra una superposición de 0.84 (siendo un valor de 1 indicativo del 100% de identidad). Imagen obtenida con el software UCSF Chimera usando como templado el modelo ID: 6zqc.30 de levadura.

Clonación en el vector pGEMT-Easy

Para obtener las clonas celulares de *L. major* que expresan a la proteína recombinante Nop56-PTP, se diseñaron un par de oligonucleótidos (que incluían los sitios de restricción para *Xma*I en el extremo 5' y *Xba*I en el 3') para amplificar por PCR el gen de Nop56 (excluyendo el codón de paro) a partir del DNA genómico de promastigotes de *L. major* en cultivo. Para corroborar que la amplificación fue correcta, se analizó el producto de la reacción por electroforesis en geles de agarosa. Como se muestra en la figura 24A, la banda resultante tiene el tamaño esperado correspondiente a LmNop56, que es de 1,431 pb. Posteriormente, LmNop56 fue purificado en un gel, y la integridad y pureza del DNA obtenido fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa (Figura 24B). Ante la ausencia de bandas contaminantes, procedimos a realizar la reacción de adenilación para, posteriormente, poder clonar LmNop56 puro en el vector pGEMT-Easy.

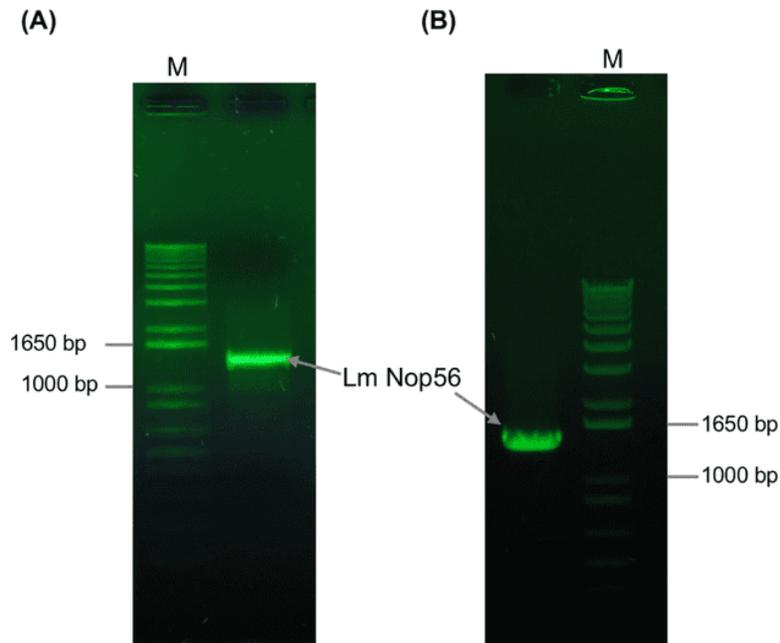


Figura 24. LmNop56 analizado en geles de agarosa. (A) LmNop56 producto de PCR utilizando la enzima Pfx Platinum. (B) LmNop56 purificado con un kit comercial. Geles de agarosa al 1% teñido con Midory Green. M, marcador de 1Kb Plus (Invitrogen).

Después de que LmNop56 fuera purificado y adenilado, se ligó en el vector pGEM-T Easy, lo que resultó en la generación del plásmido pGe-LmNop56, que tiene un tamaño de 4,449 pb (Figura 25A). Esta construcción fue empleada para transformar células de *E. coli* mediante un choque térmico a 42° C. Las bacterias que lograron incorporar el plásmido fueron seleccionadas en medio LB-agar con ampicilina (100 µg/ml). Del conjunto de colonias que crecieron sobre la placa, fueron recuperadas tres al azar, inoculadas en medio LB líquido que contenía ampicilina (100 µg/ml) e incubadas toda la noche a 37°C con agitación vigorosa. Al día siguiente, 600 µL de cada cultivo fueron recuperados, mezclados con 200 µL de glicerol al 50% y almacenados a -70°C. Posteriormente, las bacterias restantes se empastillaron y el DNA del vector pGe-LmNop56 fue purificado. Para obtener la mayor cantidad de pGe-LmNop56 se realizaron dos eluciones (Figura 25B). El DNA plasmídico

obtenido se cuantificó por espectrofotometría y se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 25B).

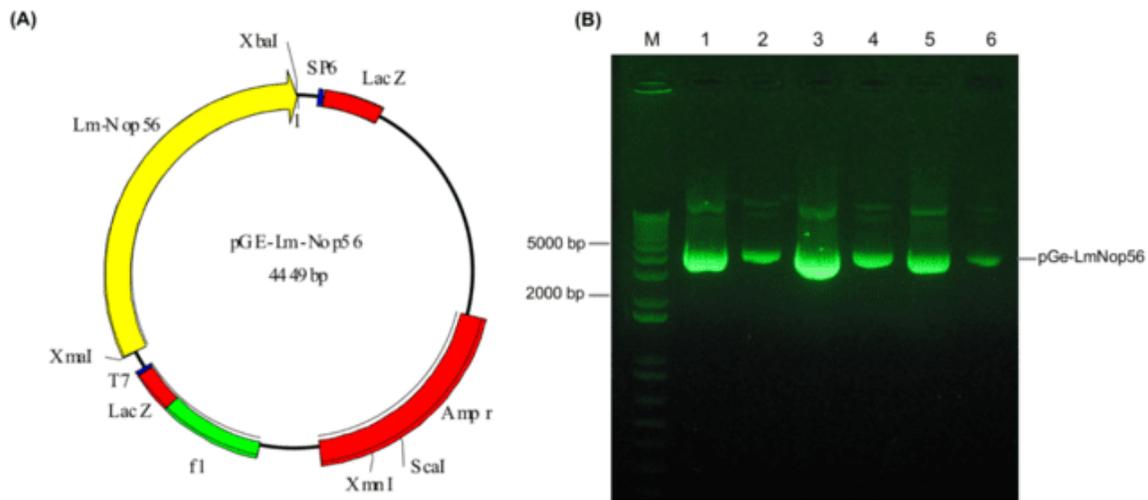


Figura 25. Plásmido pGe-LmNop56. **(A)** Mapa de la construcción pGe-LmNop56. Son indicadas las secuencias de corte para las enzimas *XbaI* y *XmaI*. **(B)** Plásmido purificado de tres colonias transformadas y elegidas al azar. La elución del DNA se realizó por duplicado. Carriles 1 y 2 colonia 1; 3 y 4 colonia 2; 5 y 6 colonia 3. Líneas 1, 3 y 5, DNA de la primer elución. Carriles 2, 4 y 6, DNA de la segunda elución. 2 μ L del DNA de cada elución fue fraccionado en gel de agarosa y teñido con Midory green. M, marcador de 1 Kb Plus de Invitrogen.

Posteriormente, el plásmido pGe-LmNop56 de las tres colonias fue sometido a análisis de restricción utilizando las enzimas *XmaI* y *XbaI* (Figura 26). Los productos de la reacción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa. Bajo la luz ultravioleta, observamos los dos fragmentos que esperábamos obtener con la digestión del plásmido; el primero de aproximadamente 3,000 pb (cuerpo del vector pGEMT-Easy) y el segundo alrededor de 1,431 pb, que corresponde a LmNop56 (Figura 26). Basándonos en los resultados, decidimos enviar al servicio de secuenciación de DNA los plásmidos pGe-LmNop56 de las clonas 2 y 3. El análisis de los cromatogramas obtenidos nos permitió confirmar la ausencia de errores y también elegir el DNA plasmídico de la clona 2 para continuar con la siguiente etapa experimental del proyecto.

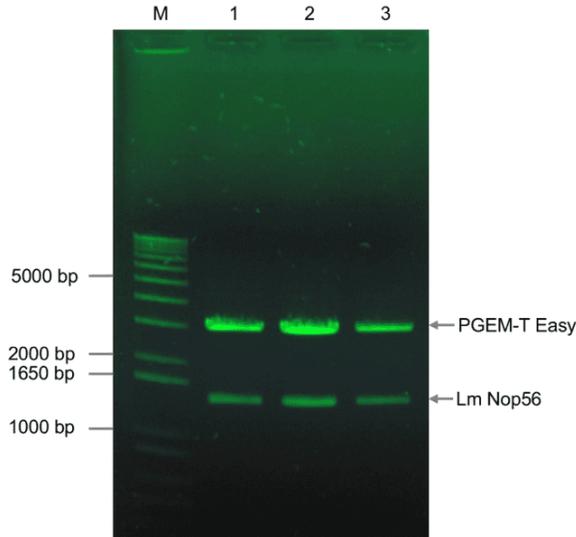


Figura 26. Análisis de restricción del pGe-LmNop56. 1 μ g de DNA plasmídico fue mezclado con las enzimas de restricción *Xma*I y *Xba*I e incubados a 37°C por 5 horas. Los fragmentos resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observan dos bandas, la primera de 3,000 pb que es el vector pGEMT-Easy y la segunda de aproximadamente 1,431 pb que corresponde a LmNop56. M, marcador de 1 Kb Plus de Invitrogen. Gel teñido con Midory green.

Generación del plásmido LmNop56-PTP

Después, se realizó la subclonación de LmNop56 en el vector PTP. Para esto fueron digeridos, en tubos separados, los plásmidos pGE-LmNop56 y pB6-PTP con las enzimas de restricción *Xba*I y *Xma*I para liberar el gen LmNop56 y el cuerpo del vector PTP, respectivamente. Al finalizar la reacción enzimática, los DNAs fueron fraccionados en geles de agarosa por electroforesis. El gen LmNop56 y el cuerpo del vector PTP fueron recuperados, y su integridad y pureza fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa (Figura 27) y espectrofotometría. En experimentos separados, obtuvimos una banda única de aproximadamente 6,600 pb que corresponde al tamaño del cuerpo del vector PTP (Figura 27A) y una banda que oscila alrededor de las 1,431 pb que es LmNop56 (Figura 27B).

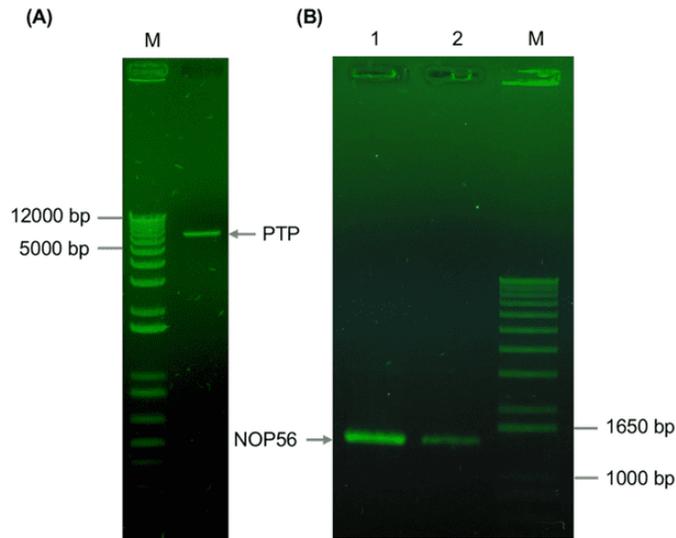


Figura 27. Gel de agarosa con el vector PTP y LmNop56 puros. DNA purificado con el uso de un kit comercial y analizado por electroforesis en gel de agarosa. **(A)** Banda de aproximadamente 6,600 pb que representa el cuerpo del vector PTP. **(B)** Señal de 1,431 pb que corresponde a LmNop56. Carril 1, LmNop56 primer elución; carril 2, LmNop56 segunda elución. En ambas imágenes se muestra el marcador (M) de 1 Kb plus de Invitrogen. Geles de agarosa al 1% teñidos con Midory Green.

Una vez que fueron purificados, el DNA de LmNop56 fue ligado al vector PTP por la actividad de una DNA ligasa comercial. La construcción resultante fue pLmNop56-PTP con un tamaño de 8,093 pb (Figura 28).

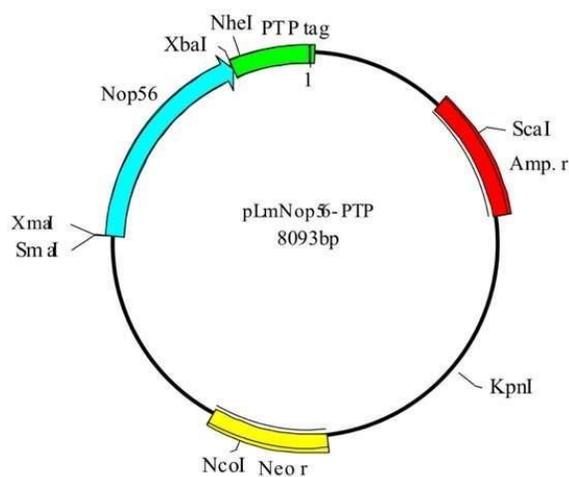


Figura 28. Mapa predicho del plásmido pLmNop56-PTP. Flanqueando al gen LmNop56 (en azul) están los sitios de restricción para *XmaI* y *XbaI*. En verde se muestra la bandera PTP.

El vector pLmNop56-PTP (Figura 28) fue empleado para realizar una nueva transformación bacteriana. El DNA plasmídico aislado de una de las colonias positivas fue caracterizado cuidadosamente debido a que con este plásmido se realizaría la transfección de promastigotes de *L. major* en cultivo. Con este fin, se hizo un análisis de restricción con tres endonucleasas diferentes (Figura 29) además de la secuenciación del DNA para corroborar la ausencia de errores y que LmNop56 estuviera correctamente posicionada en marco de lectura con la bandera PTP.

Mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos de pLmNop56-PTP con el software DNAMAN identificamos tres sitios de corte para *XhoI*, uno para *XmaI* y otro para *XbaI*. El tratamiento simultáneo con las enzimas *XmaI* y *XbaI* libera a LmNop56 y al vector PTP. Con base en lo anterior era posible inferir con precisión el tamaño de los fragmentos que resultarían al digerir nuestro plásmido con estas endonucleasas. Como había sido estimado, *XhoI* produce tres segmentos de DNA (~4,600; 3,000 y 500 pb; figura 29, carril 2), con *XmaI* y *XbaI* se lineariza el vector (banda de ~8,600 pb; carriles 3 y 4, respectivamente; Figura 29) y el tratamiento simultáneo de pLmNop56-PTP con *XmaI* y *XbaI*, libera a LmNop56 (1,431 pb) del vector PTP (6,600 pb) (Figura 29, carril 5).

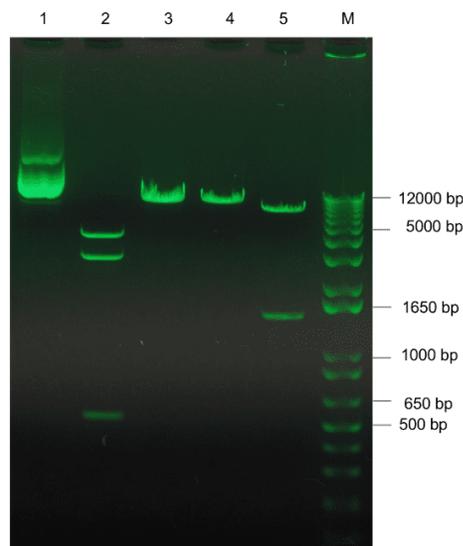


Figura 29. Análisis de restricción del plásmido pLmNop56-PTP. 1 µg de DNA fue digerido con diferentes endonucleasas. Carril 2, *XhoI*; carril 3, *XmaI*; carril 4, *XbaI*; Carril 5, *XmaI* + *XbaI*. pLmNop56-PTP sin digerir se observa en el carril 1. M, marcador de 1 Kb plus de Invitrogen. Gel de Agarosa, 1% teñido con Midory Green.

Adicional a lo anterior, el análisis de los cromatogramas recibidos del servicio de secuenciación de DNA permitió comprobar que el plásmido pLmNop56-PTP no contenía ningún cambio y, también que LmNop56 estaba en marco de lectura correcto con la etiqueta PTP (Figura 30).

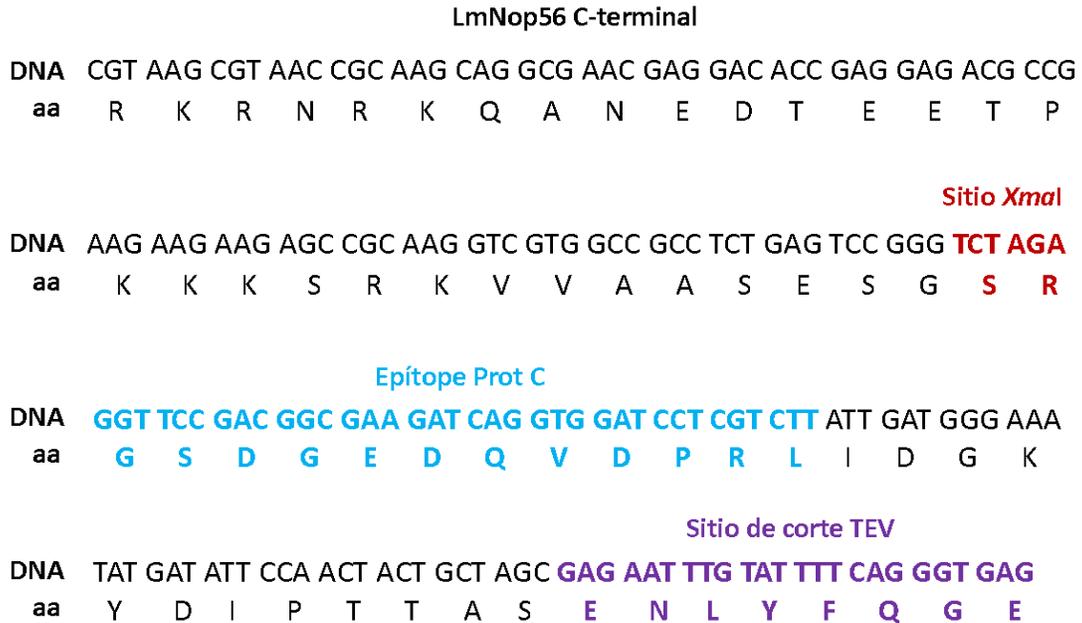


Figura 30. LmNop56 está en marco de lectura con la etiqueta PTP. Son ilustradas las secuencias de nucleótidos (DNA) y de aminoácidos (aa) del extremo carboxilo de LmNop56 fusionada con parte de la bandera PTP. El epítotope Prot C se muestra en letras azules y el sitio de corte para la proteasa TEV se ilustra con letras moradas. La secuencia de restricción de la proteína *Xma*I es indicada en color café.

Como los resultados fueron los esperados, procedimos con el aislamiento del pLmNop56-PTP a gran escala, debido a que para cada transfección de promastigotes de *L. major* son requeridos 25 µg de DNA plasmídico.

Obtención y caracterización de poblaciones estables LmNop56-PTP

Tres lotes de 100 millones de promastigotes de *L. major* de fase media logarítmica fueron electroporados con el vector pLmNop56-PTP e incubados en medio BM con G418 (fármaco de selección). Aproximadamente tres semanas post-transfección, se obtuvieron las poblaciones estables A, B y C que tenían una morfología, movilidad y división celular adecuadas. La caracterización de estos parásitos se realizó por ensayos Western blot utilizando extractos proteicos y un anticuerpo primario que

está dirigido contra el epítipo Flag presente en la bandera PTP que está fusionado con LmNop56 (Figura 31).

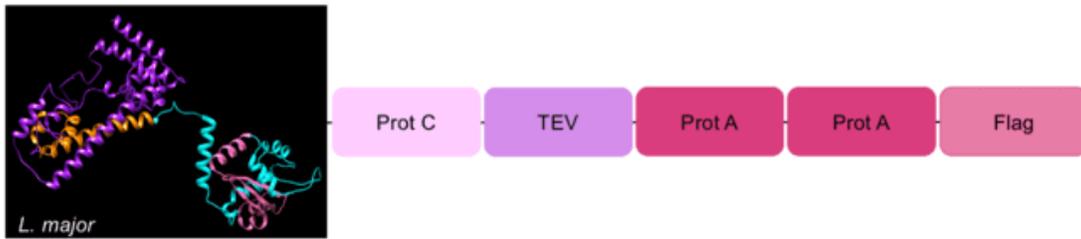


Figura 31. Representación gráfica de la proteína recombinante LmNop56-PTP. A la izquierda se muestra la figura tridimensional de LmNop56 (52.68 kDa) obtenida mediante medios computacionales. A la derecha se ilustran las cuatro regiones que conforman la bandera PTP: un dominio de la proteína C (2.73 kDa), un sitio de corte para la proteasa TEV (1.15 kDa), dos regiones de la proteína A (7.62 kDa cada uno) y el Flag (1.28 kDa). Es importante mencionar que la figura no está a escala. Juntos agregan una masa de 20.4 kDa, por lo que LmNop56-PTP tiene un peso aproximado de 73 kDa.

Se observó que LmNop56-PTP se expresa en las tres poblaciones obtenidas, pues fue revelada una banda única con una masa molecular cercana a los 73 kDa en las muestras analizadas (Figura 32; carriles A-C). La masa de esta proteína recombinante resulta de la suma de los 52.68 kDa de LmNop56 y 20.4 kDa de la bandera PTP (Figura 31). Como era de suponerse, esta señal está ausente en parásitos silvestres (Figura 32; carril WT). Con base en este resultado, decidimos utilizar parásitos de la población C para obtener clones LmNop56-PTP.

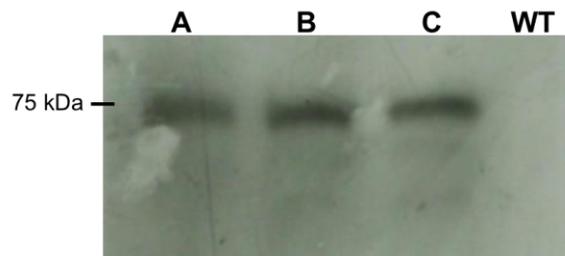


Figura 32. Caracterización de las tres poblaciones LmNop56-PTP por Western blot. Se utilizaron extractos proteicos de promastigotes silvestres (WT) y de las poblaciones transgénicas A, B y C. La presencia de la proteína recombinante fue puesta de manifiesto con el uso de un anticuerpo primario dirigido contra el epítipo Flag y uno secundario acoplado a peroxidasa de rábano. Se observa un producto cercano al marcador de los 75 kDa que corresponde a LmNop56-PTP. (La marca 75 kDa corresponde al marcador CSL-BBL de Cleaver Scientific).

Obtención y caracterización de las clonas celulares LmNop56-PTP

A continuación, se procedió a obtener clonas celulares de LmNop56-PTP. Para ello, fueron aislados 100, 250, 500, 1000 y 2000 promastigotes de la población C por diluciones seriadas. Estos parásitos se esparcieron sobre cajas Petri que contenían agarosa, medio BM y G418. Las células se incubaron a 28°C en atmósfera de CO₂. Aproximadamente 15 días post-siembra, fueron transferidas seis colonias de promastigotes transgénicos a cajas de cultivo que contenían medio BM fresco con G418 y se mantuvieron en la fase logarítmica de crecimiento. Por Western blot verificamos la expresión de la proteína recombinante en todas las clonas (Figura 33). Encontramos una banda cercana al marcador de 75 kDa, que es equivalente a LmNop56-PTP (Figura 33). Ningún tipo de señal fue visualizada en parásitos silvestres (Figura 33; carril WT). Con base en este resultado, tomamos la decisión de continuar el proyecto con las clonas 5 y 6.

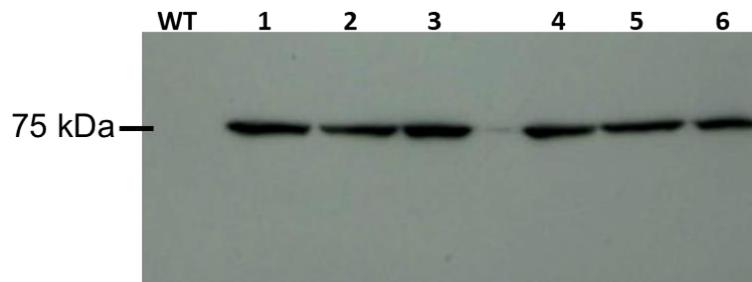


Figura 33. Western blot de las seis clonas celulares LmNop56-PTP. Se emplearon extractos proteicos de cada clona, el anti-Flag y una IgG anti-conejo acoplada a HRP. Encontramos una banda de 73 kDa en todos los extractos proteicos analizados. En parásitos silvestres (WT) no hay presencia de ninguna señal. La marca de 75 kDa corresponde al marcador CSL-BBL de Cleaver Scientific.

En el laboratorio al que pertenezco contamos con una variedad de anticuerpos primarios comerciales que reconocen tres epítopes de la bandera PTP y también con un suero policlonal de ratón dirigido contra la LmNop56 endógena. Iniciamos la caracterización de las clonas 5 y 6 con la finalidad de seleccionar una, la más adecuada, para realizar los ensayos de purificación por cromatografía de afinidad en tándem acoplada con espectrometría de masas para identificar los factores proteicos asociados con LmNop56.

En el primer ensayo que se realizó por Western blot utilizamos un anticuerpo primario dirigido contra el epítipo de la proteína A y extractos proteicos de las dos clonas seleccionadas. En la placa radiográfica observamos una banda intensa cercana a los 75 kDa que representa a LmNop56-PTP (Figura 34, flecha gris). Adicionalmente, se encontraron algunas señales extra de menor tamaño, que fueron consideradas productos de degradación de la proteína recombinante que conservan la etiqueta PTP (Figura 34). Considerando nuestro resultado, se decidió desarrollar la siguiente parte del proyecto con parásitos de la clona 6.

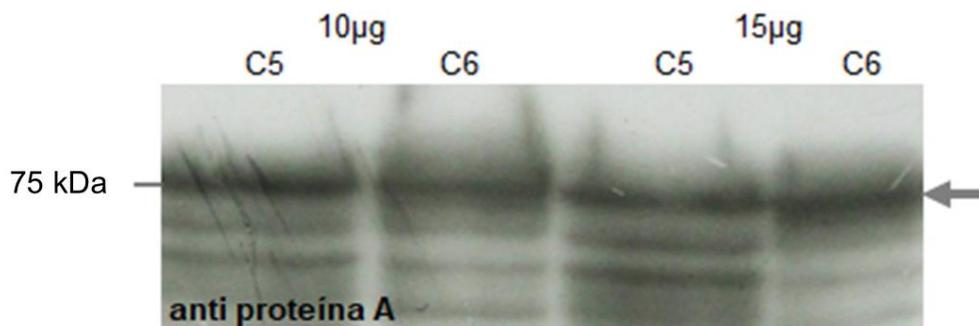


Figura 34. Análisis de la expresión de LmNop56-PTP en las clonas celulares 5 y 6. 10 y 15 µg de extracto proteico fueron tratados con un anti-Prot-A comercial. Se encontró una banda intensa alrededor de los 75 kDa que corresponde con LmNop56-PTP (flecha gris). Varias bandas adicionales fueron observadas y consideradas como productos de degradación de la proteína recombinante. La marca de 75 kDa corresponde al marcador CSL-BBL de Cleaver Scientific.

Posteriormente, promastigotes de la línea celular 6 fueron cosechados y lisados por dos métodos diferentes: 1) con buffer RIPA o 2) con calor. Una vez obtenidos los extractos proteicos, se hicieron los ensayos tipo Western blot en los que utilizamos los anticuerpos primarios anti-proteína C (Figura 35A) o anti-Flag (Figura 35B). Independientemente del método de lisis, los resultados nos permitieron confirmar la presencia de la versión recombinante de LmNop56 (Figura 35; flecha gris). Alguna banda adicional importante fue observada, especialmente en los extractos proteicos obtenidos de promastigotes lisados con fuego. Debido a como son procesadas las muestras, nosotros las consideramos como un producto de degradación de la proteína recombinante que conserva el PTP. Ningún tipo de señal fue observada en los carriles donde se depositó la proteína de los parásitos silvestres (Figura 35; WT).

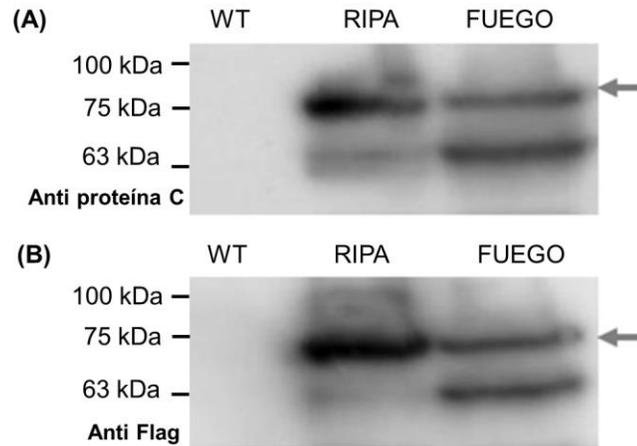


Figura 35. Análisis de la expresión de LmNop56-PTP en la clona 6 evaluada por Western blot. (A) LmNop56-PTP reconocida por el anti-proteína C. (B) LmNop56-PTP identificada con el anti-Flag. Los extractos proteicos fueron obtenidos mediante buffer RIPA (R) o por calor (F). En las placas, algunas bandas adicionales son observadas y consideradas como productos de degradación. En los extractos proteicos silvestres (WT) no hay ninguna evidencia de señal. Las marcas de kDa corresponden al marcador CSL-BBL de Cleaver Scientific.

Finalmente, fue realizado un Western blot en el que se empleó un suero policlonal hecho en ratón que está dirigido hacia LmNop56 endógena. Encontramos tres bandas principales en los carriles en los que se depositaron extractos proteicos de parásitos transgénicos lisados con buffer RIPA (Figura 36; carril R) o con calor (Figura 36; carril F). Las señales de aproximadamente 75 kDa corresponden a LmNop56-PTP (Figura 36; flecha roja). La banda mayor al marcador de 48 kDa equivale a LmNop56 endógena (Figura 36; flecha gris). También, se observa un supuesto producto de degradación de la proteína recombinante (Figura 36; asterisco). A diferencia de los ensayos anteriores, en el carril donde se depositó la proteína de *L. major* silvestre (WT) se observó, como se esperaba, una banda única de aproximadamente 53 kDa que pertenece a la proteína LmNop56 endógena (Figura 36; carril WT).

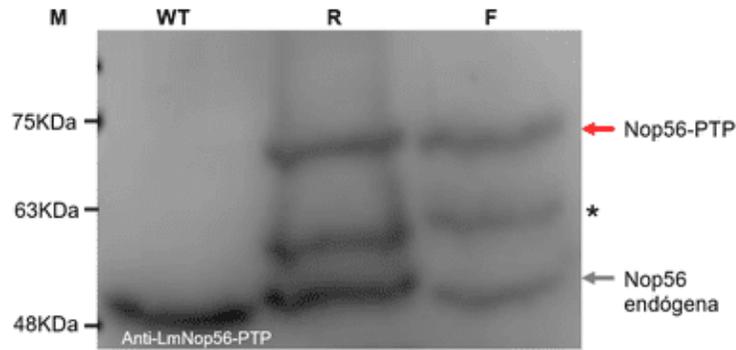


Figura 36. Análisis de la expresión de LmNop56-PTP evaluada mediante Western blot. Los carriles corresponden al marcador CSL-BBL de Cleaver Scientific (M), *L. major* silvestre (WT) y proteína de *L. major* Nop56-PTP extraída por buffer RIPA (R) o mediante calor (F). La presencia de las proteínas fue determinada utilizando un anticuerpo policlonal anti-LmNop56. Las flechas indican la proteína recombinante (flecha roja) o la endógena (flecha gris). Una banda que representa LmNop56-PTP degradada se señala con un asterisco. Como era esperado, este anticuerpo primario reconoce la proteína endógena LmNop56 en extractos silvestres.

Localización subcelular de la proteína LmNop56-PTP

Como parte de la caracterización y después de confirmar que la proteína recombinante se expresa adecuadamente en la línea celular que elegimos, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para determinar la localización subcelular de LmNop56-PTP. Para realizar estos experimentos se usó el set de anticuerpos primarios mencionados en la sección anterior. Como se observa en la figura 37, se determinó que la señal fluorescente de LmNop56-PTP se concentra exclusivamente en el nucléolo (Figura 37A y B; color verde), que es un cuerpo nuclear que se tiñe débilmente con DAPI debido a su bajo contenido de DNA (Figura 37; color azul). Como control de la técnica, se utilizó el suero anti-LmNop56 que es un marcador nucleolar en *L. major* (Figura 37C; color rojo).

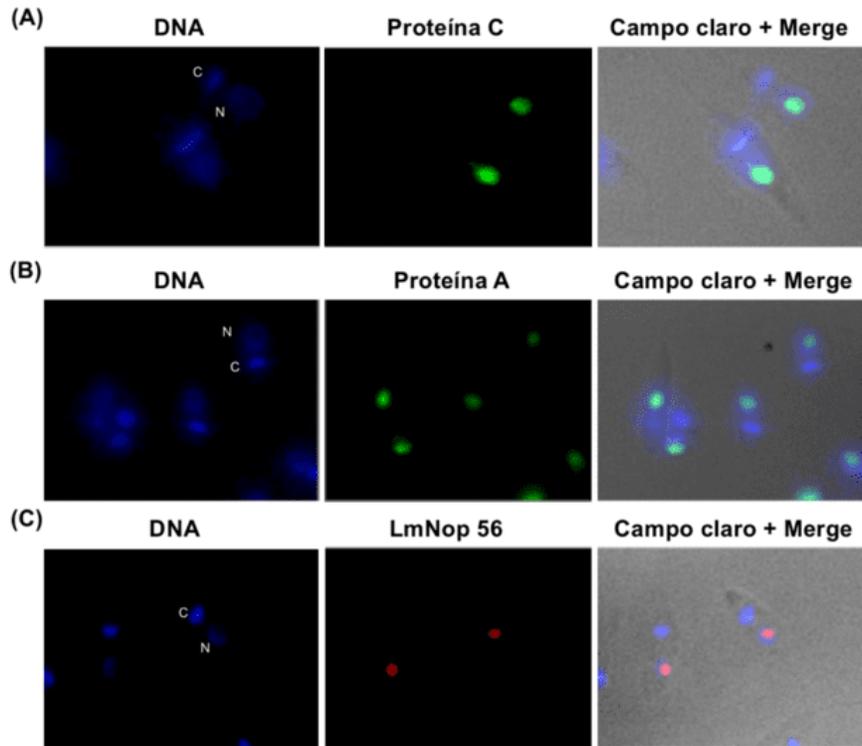


Figura 37. Localización nucleolar de LmNop56-PTP. (A) Parásitos transgénicos tratados con el anti-prot C (primario) y anti-rabbit IgG conjugado con Alexa Fluor 488 (secundario; señal verde). (B) Promastigotes transgénicos teñidos con el anti-prot A (primario) y anti-rabbit IgG conjugado con Alexa Fluor 488 (secundario; señal verde). (C) Micrografías de inmunofluorescencia indirecta de células de *L. major* WT realizada con anti-LmNop56 y el anti-mouse IgG conjugado con Alexa Fluor 568 (señal roja). El DNA fue teñido con DAPI (azul); C, cinetoplasto y N, núcleo.

Para confirmar que la señal verde fluorescente de LmNop56-PTP era nucleolar, realizamos experimentos adicionales de inmunofluorescencia indirecta donde los promastigotes transgénicos se trataron simultáneamente con dos anticuerpos primarios: uno de ellos dirigido a algún epítipo de la bandera PTP (proteína C, proteína A o Flag) y el segundo hacia la LmNop56 endógena. También fue utilizada la combinación de dos anticuerpos secundarios acoplados con diferentes versiones de Alexa Fluor. Bajo el microscopio de epifluorescencia observamos que la señal verde fluorescente de LmNop56-PTP (Figura 38A-C; Proteína C, Proteína A o Flag, respectivamente) y de la proteína endógena (Figura 38A-C; LmNop56 color rojo) se concentra en el nucléolo de los parásitos transgénicos. La co-localización entre

ambas proteínas fue evaluada utilizando el software Zen blue de Zeiss. Cuando fueron sobrepuestas las imágenes capturadas observamos la aparición de coloración amarilla, esto nos sugirió que las dos proteínas se ubican, al mismo tiempo, dentro del nucléolo de los promastigotes de la línea 6 (Figura 38; Merge).

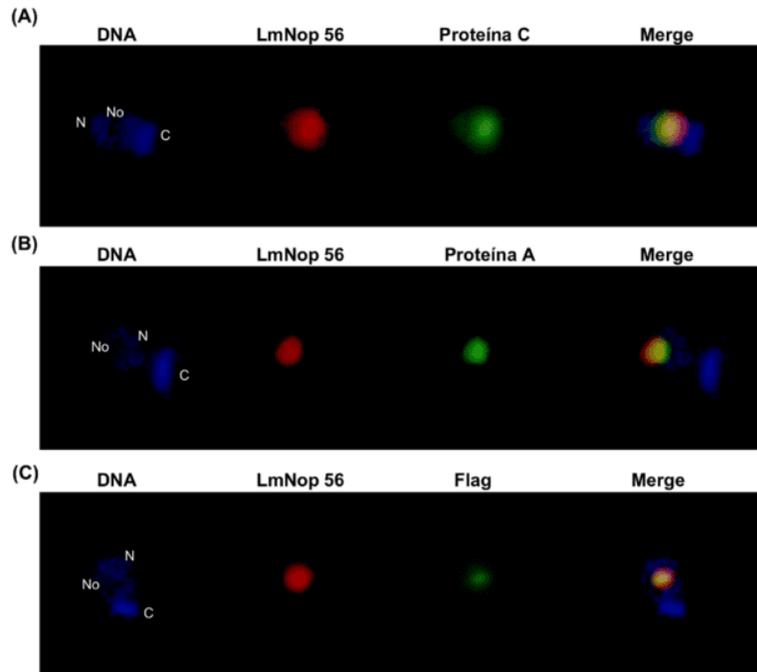


Figura 38. Co-localización de la versión recombinante LmNop56-PTP con LmNop56 endógena evaluada por inmunofluorescencia indirecta doble. (A) Las células se incubaron con anti-LmNop56 más anti-proteína C. (B) Los parásitos fueron tratados con anti-LmNop56 más anti-proteína A. (C) Los promastigotes interaccionaron con anti-LmNop56 más anti-Flag. En todas las condiciones experimentales se utilizó la combinación de anticuerpos secundarios anti-mouse IgG conjugado con Alexa Fluor 568 (rojo) y anti-rabbit IgG acoplado a Alexa Fluor 488 (verde). El DNA fue teñido con DAPI (azul). C, cinetoplasto; N, núcleo y No, nucléolo. La señal amarilla visible en el merge nos sugirió la co-localización de las dos proteínas.

Finalmente, una laminilla que contenía parásitos LmNop56-PTP tratados con anti-LmNop56 más anti-proteína C fue analizada bajo el microscopio confocal con la finalidad de determinar con mayor precisión la localización subcelular de la proteína recombinante y para obtener micrografías con una mejor resolución. Fueron colectadas imágenes de solamente un plano focal (Figura 39) además de secciones ópticas seriadas (Figura 40). Con los resultados obtenidos comprobamos que LmNop56-PTP (Figura 39A, color verde) se concentra en la región del núcleo claramente excluida de tinción con DAPI, que corresponde al nucléolo. LmNop56

endógena (Figura 39B, color rojo) es nuestro marcador de nucléolo. La fusión de las imágenes produce la aparición de una coloración amarilla, lo que indica que las dos versiones de Nop56 co-existen simultáneamente dentro del nucléolo en nuestros parásitos transgénicos (Figura 39C-D, color amarillo).

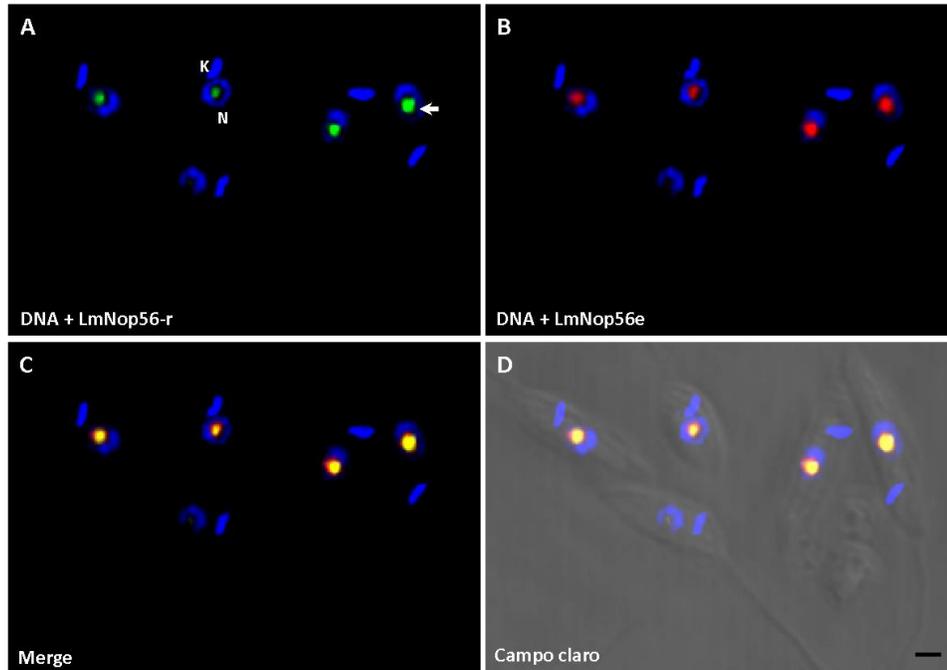


Figura 39. Micrografías obtenidas con un microscopio confocal en las que se observa la co-localización nucleolar de las dos versiones de LmNop56. Se realizó una inmunofluorescencia indirecta doble en la que las células se incubaron con anti-LmNop56 + anti-proteína C y con los anticuerpos secundarios anti-mouse IgG conjugado con Alexa Fluor 568 (rojo) y anti-rabbit IgG conjugado con Alexa Fluor 488 (verde). A) LmNop56-PTP (verde). B) LmNop56 endógena (rojo). C) Co-localización nucleolar de LmNop56-PTP y LmNop56 endógena (amarillo) sin campo claro y D) con campo claro. El DNA nuclear (N) y del cinetoplasto (K) fue teñido con DAPI (color azul). La flecha señala al nucléolo. El tamaño de la barra equivale a 2 μ m.

El microscopio confocal permite hacer cortes ópticos que ayudan a determinar la co-localización de biomoléculas (en este caso la LmNop56-PTP y la LmNop56 endógena). Tomando en cuenta lo anterior, se obtuvieron cerca de 40 secciones (sólo se muestran 36) de un promastigote transgénico procesado para inmunofluorescencia indirecta doble. Las micrografías adquiridas fueron ordenadas secuencialmente para poder distinguir con claridad que la LmNop56-PTP (señal verde) se encuentra físicamente cerca del lugar donde se concentra la proteína

endógena (Figura 40; color rojo). La co-localización más importante entre ambas moléculas (color amarillo) parece ocurrir hacia la zona central del nucléolo esférico (Figura 40, líneas 3-4), probablemente en el componente fibrilar.

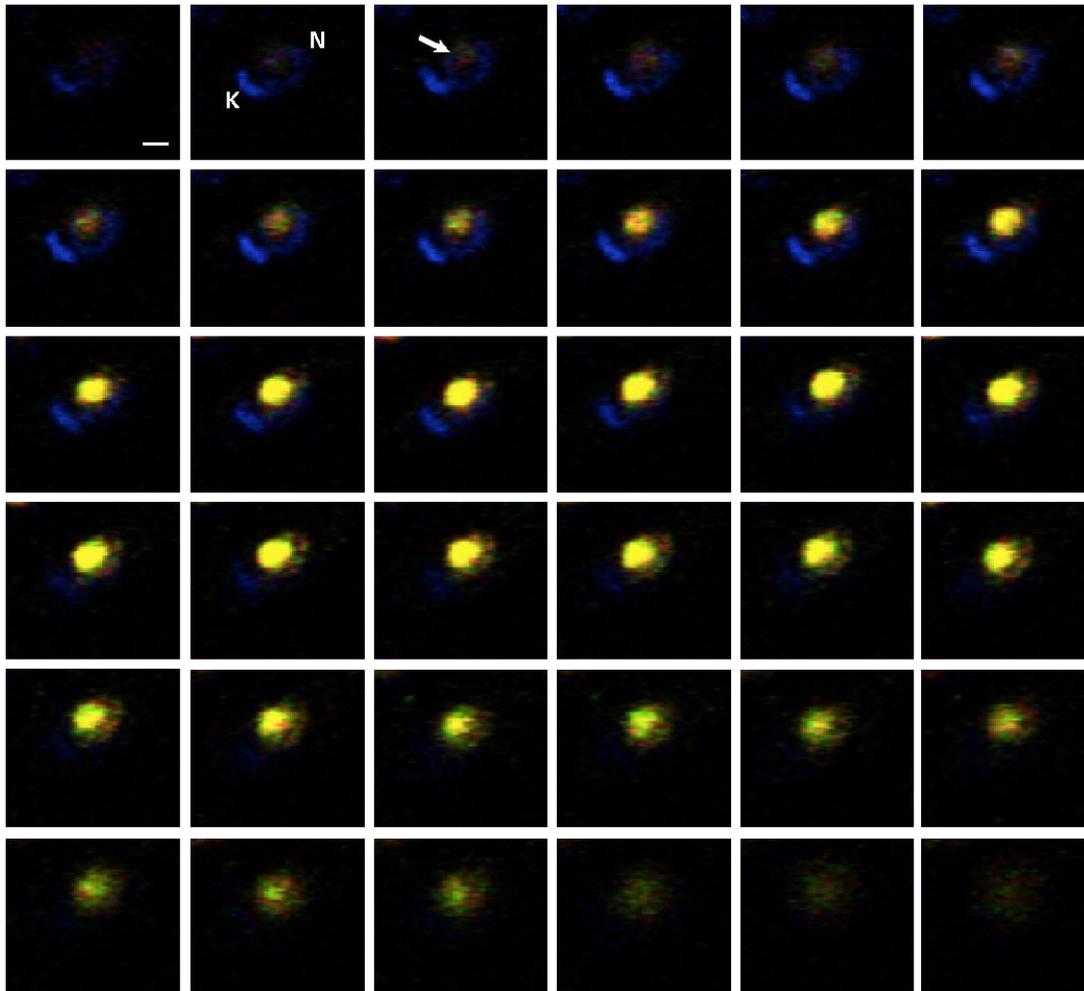


Figura 40. Cortes ópticos seriados de un promastigote transgénico capturados por microscopía confocal. La localización subcelular de las dos versiones de LmNop56 es observada en color amarillo. La flecha blanca señala el nucléolo. N, núcleo; k, cinetoplasto. El tamaño de la barra equivale a 2 μ m. Purificación de proteínas asociadas con LmNop56-PTP por cromatografía de afinidad

Una vez que se confirmó la expresión y localización nucleolar de LmNop56-PTP en la línea celular seleccionada, se realizó el aislamiento de las proteínas que potencialmente interactúan con Nop56 en *L. major*, esto mediante cromatografía por afinidad en tándem, utilizando dos resinas distintas; la primera tiene inmovilizados anticuerpos anti-prot A y la segunda un anti-prot C. Los complejos proteicos

obtenidos mediante estas cromatografías, se concentraron en columnas Amicon® Ultracel 3 K y finalmente con ayuda de vacío se obtuvo un volumen final de 15 μ L. Una alícuota de 2.5 μ L fue analizada en un gel de poliacrilamida con un gradiente que va del 4 al 15%. La muestra proteica se mezcló con solución Laemmli, se desnaturalizó con calor y se fraccionó a 80 volts durante dos horas. Las proteínas fraccionadas fueron visualizadas por tinción con el colorante Sypro Ruby bajo luz ultravioleta. En el gel se encontró una amplia gama de bandas con distinta masa molecular que están distribuidas a lo largo de todo el carril de depósito (Figura 41). De acuerdo al marcador de peso molecular empleado, nosotros estimamos que al menos están presentes Nop56 y Nop58 (Figura 41, flecha blanca y negra, respectivamente) además de Fibrilarina (figura 41 flecha roja). Por el patrón de bandeado obtenido esperábamos identificar un número importante de proteínas potencialmente asociadas con LmNop56.

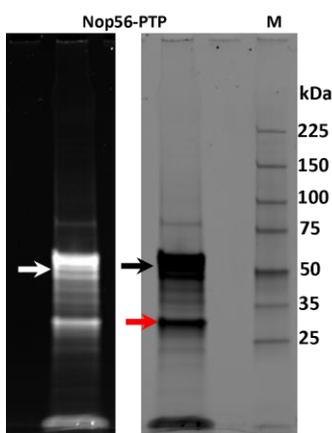


Figura 41. Imagen del mismo gel de poliacrilamida-acrilamida mostrado en dos canales diferentes. Fueron separados 2.5 μ L del material que co-purificó con LmNop56-PTP. Se encontraron varias bandas de diferente tamaño distribuidas a lo largo del carril. Las flechas blanca y negra indican una zona donde pudieran estar Nop56 (53 kDa) y Nop58 (66 kDa). La flecha roja señala a la probable Fibrilarina (31 kDa). El gel se tiñó con Sypro Ruby y el registro se realizó bajo la luz ultravioleta. M; Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers Promega.

Identidad de las proteínas que co-purificaron con LmNop56-PTP

Finalmente, los 12.5 μ L del extracto proteico purificado restantes fueron concentrados en una matriz de poliacrilamida y enviados para su análisis por cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas a la Upstate Medical University en la ciudad de Syracuse, New York. Los resultados que obtuvimos

indican la co-purificación de más de 200 proteínas diferentes (Figura 42 y Tabla 5). Fueron identificados los cuatro componentes del *core* proteico de las snoRNPs caja C/D (Snu13, Fibrilarina, Nop58 y Nop56) y los de las snoRNPs caja H/ACA (Nop10, Gar 1, Nhp2 y Cbf5). También co-purificaron factores asociados con U3, diversas proteínas nucleolares, moléculas involucradas directamente con la biogénesis de las dos subunidades ribosomales, GTPasas, cinasas, factores de ensamble de ribosomas, de igual manera factores de inicio de la traducción y ocho RNA helicasas diferentes. También se encontraron histonas, proteínas de choque térmico, de asociación con mRNA y proteínas hipotéticas nucleolares. Obtuvimos un número elevado de las proteínas ribosomales que componen las dos subunidades del ribosoma citosólico. Además de moléculas principalmente del citoplasma y de la mitocondria, que son contaminantes comunes de este tipo de purificaciones.

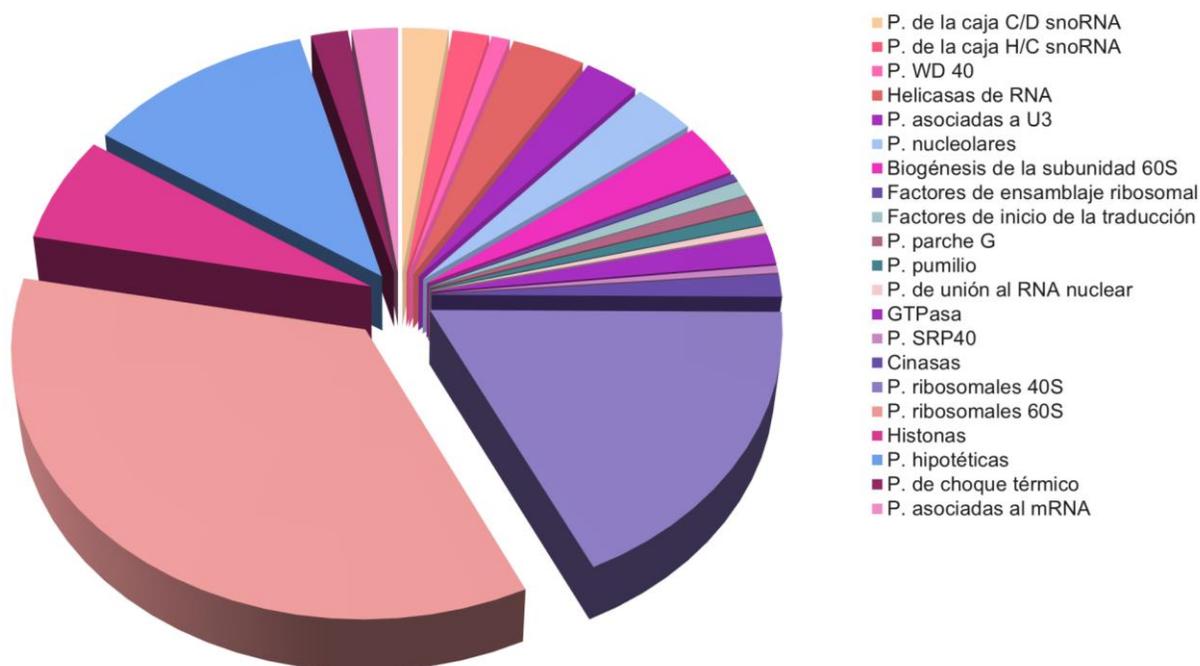


Figura 42. Resumen gráfico de las funciones de las proteínas co-purificadas con LmNop56-PTP.

Los elementos con funciones análogas fueron agrupadas en la misma categoría. Fue encontrado un número significativo de factores esenciales involucrados en la biogénesis de las dos subunidades ribosomales y de proteínas que forman parte de la estructura del ribosoma citoplasmático (ver tabla 5).

ID del gen	Proteína identificada	Masa molecular (kDa)	Número de péptidos identificados
Proteínas de la caja C/D snoRNA			
LmjF.15.1380	Nop58	66.05	131
LmjF.10.0210	Nop56	52.68	129
LmjF.36.3070	Fibrilarina	31.43	82
LmjF.19.0100	Fibrilarina	31.01	29
LmjF.15.1470	Proteína ribosomal S6 (Snu13)	13.51	22
Proteínas de la caja H/ACA snoRNA			
LmjF.21.1760	Cbf5	48.42	11
LmjF.36.0340	Proteína de la familia nucleolar (nop10p)	7.45	2
LmjF.34.4290	GAR1	21.92	2
LmjF.34.3980	NHP2	16.74	2
Proteínas WD 40			
LmjF.34.0300	RRP9	80.59	17
LmjF.23.0030	UTP15	53.91	5
Helicasas de RNA			
LmjF.35.1200	Factor de corte y empalme de pre-RNAm RNA helicasa dependiente de ATP	79.84	25
LmjF.32.0400	Helicasa HEL67 de RNA (DBP1)	67	8
LmjF.35.0370	RNA helicasa ATP dependiente con caja DEAD	46.4	5
LmjF.21.0610	RNA helicasa	74.58	1
LmjF.30.3250	RNA helicasa dependiente de ATP	115.46	1
LmjF.05.0140	RNA helicasa nucleolar II	73.38	1
LmjF.24.0250	RNA helicasa DEAD/H dependiente de ATP	66.78	1
LmjF.35.3100	RNA helicasa dependiente de ATP	100.24	1
Proteínas asociadas a U3			
LmjF.36.4580	Proteína 18 asociada al RNA pequeño nucleolar U3	48.86	7
LmjF.26.1790	Proteína nucleolar 287	296.3	5
LmjF.19.0670	Proteína UTP11 asociada al snoRNA U3	41.78	3
LmjF.35.1990	Proteína 6 asociada al snoRNA U3	115.91	2
LmjF.29.0750	Proteína MPP10	75.5	1
LmjF.23.0620	UTP7	76.56	1
Proteínas nucleolares			
LmjF.16.0890	Proteína nucleolar Nop52	74.63	4
LmjF.10.0860	Proteína Nop16	22.67	4
LmjF.04.0810	Proteína 7	77.28	3
LmjF.36.6520	Proteína ESF1 hipotética	79.52	3
LmjF.31.0200	Proteína repetida WD	48.43	2
LmjF.07.0990	Proteína nucleolar de unión al RNA	37.56	2
LmjF.11.0410	Proteína nucleolar 89	94.98	1
Biogénesis de la subunidad 60S			
LmjF.26.0010	RPF2 (proteína similar a la que contiene el dominio Brix)	40.23	6

LmjF.20.1670	BRX1	35.99	3
LmjF.35.1820	EBP2	31.58	2
LmjF.27.0450	RPF1	39.31	2
LmjF.09.0005	NSA1	41.12	1
LmjF.30.0620	RRS1	25.07	1
LmjF.10.1030	Proteína 15 de la biogénesis ribosomal	41.09	1
Factores de ensamblaje ribosomal			
LmjF.36.4650	Proteína ribosomal ácida-60S	25.29	4
Factores de iniciación de la traducción			
LmjF.36.0890	TIF6	27.12	6
LmjF.03.0980	Sub-unidad alfa del factor de la iniciación de la traducción eucariota	46.69	1
Proteínas parche G			
LmjF.17.0815	Dominio del parche G con proteína	22.16	4
LmjF.06.1020	GNO1	24.69	1
Proteínas pumilio			
LmjF.11.0470	Proteína pumilio 10	81.84	4
LmjF.32.1750	Proteína 7 de unión al RNA pumilio/PUF	85.2	4
Dominios de unión al RNA nuclear			
LmjF.32.0750	Proteína de unión al RNA	25.18	8
GTPasa			
LmjF.19.0240	Proteína de la familia GTPasa: GNL3L/Grn1	72.74	9
LmjF.33.1870	NOG1	74.35	6
LmjF.05.0460	NOG2	71.43	3
LmjF.25.1420	Proteína nuclear rtb2 de unión a GTP	24.22	3
Proteínas SRP40			
LmjF.10.0100	SRP40	28.19	7
Kinasas			
LmjF.18.0270	Cinasa 3 glicógeno sintasa	40.71	3
LmjF.21.1250	Cinasa adenilasa	35.47	1
LmjF.31.1530	Cinasa de la familia AGC serían/treonina	239.13	1
Proteínas ribosomales 40S			
LmjF.35.0400 LmjF.35.0410 LmjF.35.0420	Proteína ribosomal 40S S3A	30	9
LmjF.29.2860	Proteína ribosomal 40S parecida a S19	18.12	7
LmjF.36.5010 LmjF.36.5120	RSSA1 Proteína ribosomal SA 40S	27.49	5
LmjF.24.2070 LmjF.24.2080	Proteína NSA2 Proteína ribosomal S8 40S	24.92	5
LmjF.36.1250	Proteína ribosomal 40S S9	22.11	5
LmjF.36.0930	Proteína ribosomal 40S S18	17.39	5
LmjF.36.2860	Proteína ribosomal 40S S24e	15.77	5
LmjF.35.2010	Proteína ribosomal S6 40S	28.3	4

LmjF.01.0410	RPS7B	23.71	4
LmjF.01.0420	Proteína ribosomal S7		
LmjF.28.0960	Proteína ribosomal 40S S14	15.59	3
LmjF.26.0880	Proteína ribosomal S16 40S	16.68	3
LmjF.26.0890			
LmjF.28.2555	Proteína ribosomal 40S S17	16.51	3
LmjF.28.2560			
LmjF.36.0600	Proteína ubiquitina/ribosomal S27a	16.99	3
LmjF.11.0960	Proteína ribosomal 40S S5	21.29	2
LmjF.11.0970			
LmjF.13.0570	Proteína ribosomal 40S S12	15.6	2
LmjF.29.1800	Proteína ribosomal 40S S15A	14.69	2
LmjF.11.1190			
LmjF.30.3200	Proteína ribosomal S26	12.71	2
LmjF.28.0540			
LmjF.36.0980	Proteína ribosomal 40S S10	18.65	1
LmjF.36.0990			
LmjF.20.1650	Homólogo de proteína ribosomal S11	19.97	1
LmjF.21.1550			
LmjF.28.1010	Proteína ribosomal S20	13.01	1
LmjF.28.1030			
LmjF.11.0760	Proteína ribosomal S21	17	1
LmjF.11.0780			
LmjF.21.1060	Proteína ribosomal 40S S23	15.93	1
LmjF.21.1070			
LmjF.25.1190	Proteína ribosomal S25	13.04	1
LmjF.34.0440			
Proteínas ribosomales 60S			
LmjF.34.2870	Proteína ribosomal L3.	47.48	12
LmjF.34.2880			
LmjF.34.2890			
LmjF.34.2900			
LmjF.32.3130			
LmjF.18.0620	Proteína ribosomal 60S L10a	24.53	11
LmjF.22.1520	Proteína ribosomal 60S L14	19.9	9
LmjF.22.1560			
LmjF.15.1000	Proteína ribosomal 60S L6	21.04	8
LmjF.07.0500	Proteína ribosomal 60S L7a	29.76	8
LmjF.07.0510			
LmjF.26.0170	Proteína ribosomal 60S L7	28.84	8
LmjF.26.0180			
LmjF.29.1070	Proteína ribosomal L1a	41.02	7
LmjF.29.1090			
LmjF.35.1430	Proteína ribosomal L2 60S	28.27	6
LmjF.35.1440			
LmjF.32.3900			
LmjF.29.2460	Proteína ribosomal 60S L13	24.75	6
LmjF.15.0200	Proteína ribosomal 60S L18	25.44	6

LmjF.13.0560 LmjF.36.4510	Proteína ribosomal 60S L18	22.02	6
LmjF.35.0600 LmjF.32.0880	Proteína ribosomal 60S L18a	20.8	5
LmjF.35.1880 LmjF.35.1890 LmjF.35.1900	Proteína 60S L5	33.8	4
LmjF.21.1050 LmjF.30.3340	Proteína ribosomal 60S L9	21.55	4
LmjF.04.0750 LmjF.04.0950	Proteína ribosomal 60S L10	24.55	4
LmjF.04.0470	Proteína ribosomal 60S L11	21.64	4
LmjF.16.0460	Proteína ribosomal 60S L21	18.02	4
LmjF.35.1670 LmjF.24.2050	Proteína ribosomal 60S L26	16.17	4
LmjF.21.1720 LmjF.35.2050	Proteína ribosomal 60S L32	15.37	4
LmjF.26.2330 LmjF.26.2340	Proteína ribosomal 60S L35	15.22	4
LmjF.10.0070 LmjF.34.2470	Proteína ribosomal 135a	16.54	4
LmjF.30.3720 LmjF.30.3730	Proteína ribosomal ácida 60S P2	10.58	3
LmjF.32.0430 LmjF.24.0040	Proteína ribosomal 60S L17	19.11	3
LmjF.06.0410	Proteína ribosomal L19	28.2	3
LmjF.35.3790 LmjF.35.3800	Proteína ribosomal 60S L23	14.95	3
LmjF.35.3280 LmjF.35.3290	Proteína ribosomal 60S L31	21.25	3
LmjF.36.3740 LmjF.18.1400	Proteína ribosomal 60S L34	19.26	3
LmjF.27.1380 LmjF.27.1390	Proteína ribosomal ácida P0	34.8	2
LmjF.18.0230	Proteína ribosomal 60S L7	34.48	3
LmjF.36.6920	Proteína ribosomal de la familia L1p/L10e	30.68	2
LmjF.35.2190 LmjF.24.2210	Proteína ribosomal 60S L12	17.53	2
LmjF.36.1070 LmjF.36.1100	Proteína ribosomal L24.	14.57	2
LmjF.11.0900	Proteína ribosomal 60S L24 (RLP24)	22.59	2
LmjF.32.2690 LmjF.32.2710	Proteína ribosomal L27	15.43	2
LmjF.35.3760 LmjF.35.3780	Proteína ribosomal 60S L27A/L29	16.09	2
LmjF.11.1110 LmjF.11.1130	Proteína ribosomal 60S L28	16.27	2
LmjF.21.0730 LmjF.35.1920	Proteína ribosomal 60S L36	11.94	2

LmjF.35.5100 LmjF.33.1955	Proteína ribosomal 60S L37	9.83	2
LmjF.15.1203 LmjF.15.1207	Proteína ribosomal ácida 60S P2	10.99	1
LmjF.06.0570 LmjF.06.0580	Proteína ribosomal 60S L23a	16.33	1
LmjF.13.1670 LmjF.33.3230	Proteína ribosomal 60S L44	12.26	1
Histonas			
LmjF.21.0915 LmjF.21.0920 LmjF.21.0930 LmjF.29.1720 LmjF.29.1730 LmjF.29.1740	Histona H2A	13.82	5
LmjF.02.0020 LmjF.06.0010 LmjF.15.0010 LmjF.25.2450 LmjF.31.3180 LmjF.35.1310 LmjF.36.0020	Histona H4	11.44	4
LmjF.16.0600	Histona H3	14.66	3
Proteínas hipotéticas			
LmjF.36.2480	Proteína conservada (de unión a ácidos nucleicos)	27.93	19
LmjF.22.1610	Proteína 80 de transporte intraflagelar	76.25	5
LmjF.26.1300	Proteína nucleolar 105	125.34	3
LmjF.31.1010	Proteína conservada (RNA helicasa DDX46 dependiente de ATP)	79.83	5
LmjF.36.5100	Proteína conservada (HHPed)	105.3	4
LmjF.04.0370	Hipotética catarina p60	21.34	5
LmjF.13.0900	Proteína conservada (núcleo; nucléolo)	65.77	3
LmjF.33.0040	Proteína conservada (mitocondrial)	55.88	2
LmjF.04.0490	Proteína conservada (UPF0642)	34.07	2
LmjF.34.0240	Proteína reguladora de proceso apoptótico	153.09	1
LmjF.31.0080	Proteína YTH1	25.71	1
LmjF.11.1030	Deshidrogenasa isocitrato	27.54	1
LmjF.08.1100	Subunidad de ATP sintasa mitocondrial	42.04	1
LmjF.25.1620	ATP sintasa transportadora de protones	16.71	1
LmjF.34.2485	Proteína con repeticiones ricas en leucina	38.1	1
LmjF.10.0960	Proteína del citoesqueleto/citoplasma	92.53	1
LmjF.27.2240	Proteína de resistencia a radiación UV asociada a genes	81.86	1
LmjF.18.0820	Enzima reguladora	189.98	1
LmjF.32.2410	Proteína conservada no caracterizada	253.73	1
LmjF.09.0330	Proteína conservada	92.19	1
LmjF.31.0230	Proteína 59 asociada al flagelo	99.96	1

LmjF.28.2490	Proteína conservada	53.56	1
LmjF.19.1180	Proteína conservada	181.39	1
LmjF.30.0090	Proteína conservada (núcleo)	27.66	1
LmjF.25.1110	Proteína conservada	680.42	1
Proteínas de choque térmico			
LmjF.28.2770 LmjF.28.2780	Proteína de choque térmico hsp70	71.65	7
LmjF.33.0312	Proteína de choque térmico 83	80.53	6
LmjF.18.1370	Proteína de choque térmico 110	91.8	2
Proteínas asociadas al mRNA			
LmjF.35.4130	Proteína 2 de unión a poliadenilasa	65.35	20
LmjF.35.2200	Proteína de unión al RNA	30.26	16
LmjF.25.0080	Proteína 3 de unión a poli(A)	60.9	7
LmjF.07.0870	Factor de splicing parecido a la proteína ptsr1	42.89	4
LmjF.27.2100	Proteína de unión al RNA (YRA1)	48.4	2

Tabla 5. Proteínas que co-purifican con LmNop-PTP.

Discusión

Los parásitos del género *Leishmania* son de importancia médica debido a que causan Leishmaniasis que puede ser mortal sin un tratamiento oportuno y adecuado. Estos protozoos también son de interés biológico porque poseen características únicas a nivel genético, bioquímico y citológico. Como ejemplo relevante, la generación de las subunidades ribosomales es atípica en los tripanosomátidos debido a que el gen del rRNA 28S está fraccionado en seis o siete especies ribosomales de diferente tamaño (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2001). Para que se obtengan los rRNAs maduros se requiere la eliminación de todos los espaciadores transcritos externos e internos y la modificación química de nucleótidos particulares localizados en diversas regiones del transcrito primario, ambas actividades son catalizadas por un número grande de factores de ensamblaje ribosomal y snoRNAs caja C/D y snoRNAs caja H/ACA. La mayor parte del proceso de biogénesis de las dos subunidades ribosomales ocurre en el nucléolo, un cuerpo nuclear no membranoso (Nunes & Moretti, 2017). En contraste con lo descrito en humanos, en los tripanosomátidos se ensambla un nucléolo con un arreglo bipartita, el que que están presentes un componente fibrilar denso modesto (donde puede ocurrir la transcripción del rDNA, así como el procesamiento de pre-rRNA) y un componente granular (aquí se podría llevar a cabo la modificación tardía y el ensamblaje de las subunidades ribosomales). A la fecha no han sido descritos los centros fibrilares (que representan regiones nucleolares enriquecidas con rDNA además de factores de transcripción de la RNA pol I) que están presentes en nucléolos de algunos vertebrados con desarrollo amniótico (Thiry & Lafontaine, 2005).

El nucléolo es un organelo donde se concentran cantidades elevadas de diferentes tipos de RNA y de proteínas. Una proteína que atrajo nuestra atención es Nop56. Esta molécula es parte de snoRNPs con caja C/D y sirve como un andamio molecular para ensamblar correctamente un *core* proteico formado por Snu13, Nop58, la metiltransferasa Fibrilarina y Nop56. La interacción Nop56-Fibrilarina es indispensable y suficiente para que ocurra correctamente la metilación del pre-rRNA. Esta función se ha descrito en homólogos de Nop56 pertenecientes a

Arqueas y eucariotas (Aittaleb, *et al.*, 2003, Gagnon, *et al.*, 2012 y Lechertier, *et al.*, 2009). También, ha sido sugerido que Nop56 está involucrada directamente en el procesamiento temprano del pre-rRNA (Hayano, *et al.*, 2003). Por lo anterior decidimos realizar la caracterización de Nop56 e identificar el conjunto de complejos proteicos que interaccionan con esta proteína *in vivo* en promastigotes del protozoo patógeno *L. major*.

Los análisis *in silico* de la secuencia de esta proteína nucleolar de diferentes especies tanto del género *Leishmania* (Figura 18) como de *Trypanosoma* (Figura 19) y otros eucariotas (Figura 20), nos permitieron identificar que hay una conservación elevada en algunos segmentos entre las diferentes versiones de la proteína. Aunque, como era de esperarse, mientras más alejado evolutivamente estuviera el taxón, menos residuos conservados tendrían las secuencias ortólogas. Entre los miembros del género *Leishmania* el porcentaje de identidad es superior al 94%, contra *Trypanosomas* alrededor del 80% y el porcentaje que guarda con la proteína de levadura es del 47.7%. El grado de conservación entre las Nop56 de *L. major* y de *S. cerevisiae* se refleja también a nivel de la arquitectura 3D. La disposición espacial entre LmNop56 y ScNop56 comparte un score de similitud de 0.84 (un valor de 1 indica un plegamiento 100% idéntico), dato que sugiere que son altamente parecidas (Figura 23). LmNop56 está formada por los dominios conservados y funcionales Nop5NT, Nop y NOSIC (Figura 18, tabla 4) que han sido identificados en otros ortólogos de eucariontes y Arqueas. Además, LmNop56 presenta un número y distribución de elementos estructurales secundarios similares a los predichos en la proteína análoga de levadura (Figura 21). En conjunto, estos resultados nos sugieren que LmNop56 puede participar activamente en la biogénesis de las subunidades ribosomales de *L. major*. Cabe recordar que Nop56 es indispensable para el correcto ensamblaje y función de las snoRNPs caja C/D, esta proteína se conservó a lo largo de la evolución. Se han construido un árbol filogenético de los homólogos de Nop56/Nop58 que incluye diferentes especies eucariotas e incluso algunas Arqueas (Newman, *et al.*, 2000).

Cuando se obtuvo la línea celular LmNop56-PTP, se procedió con la caracterización de estos nuevos parásitos transgénicos. En este sentido decidimos comenzar con el análisis de la expresión de la proteína. Los diferentes ensayos de Western blot realizados con diversos anticuerpos primarios dirigidos contra alguno de los componentes de la bandera PTP (Figura 31) nos demostraron la correcta expresión de una proteína recombinante que posee una masa molecular de alrededor de 73 kDa. Después y debido a que se han descrito posibles alteraciones del destino celular final de algunas proteínas inducidos por la presencia de etiquetas peptídicas extras (como el propio PTP), fue investigada la localización subcelular de nuestra proteína recombinante. Así que, mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta, observamos que LmNop56-PTP se concentra exclusivamente en el nucléolo de los parásitos transgénicos (Figuras 37-40). La señal observada por la proteína recombinante co-localiza, casi en su totalidad, con la encontrada con el marcador nucleolar Nop56 descrito para *L. major* que empleamos aquí como control (Nepomuceno-Mejía, *et al.*, 2018). La adecuada expresión y la localización dentro del nucléolo de promastigotes transgénicos nos sugirieron que LmNop56-PTP puede ser ensamblada en snoRNPs cajas C/D y participar en el procesamiento del rRNA en *L. major*.

En organismos modelo se ha descrito que la síntesis del pre-rRNA está generalmente acompañada con su procesamiento co-transcripcional (Turowski & Tollervey, 2015), evento que favorece el correcto plegamiento, maduración y ensamblaje en subunidades ribosomales. En este proceso se asocian decenas de moléculas que son reclutadas hacia el transcrito recién sintetizado en un orden específico y forman un complejo conocido como proceosoma. Dentro de estas proteínas encontramos algunas exo- o endo-nucleasas que son indispensables para el corte en determinadas regiones del precursor ribosomal, lo que permite la liberación de las especies de rRNA individuales. Otras actividades enzimáticas como helicasa, GTPasa, ATPasa, cinasa, metiltransferasa, chaperona, también son requeridas para la correcta biogénesis ribosomal.

En *L. major* poco es conocido sobre la generación de las subunidades ribosomales, proceso celular que puede presentar diferencias notorias con lo descrito en otros organismos. En este protozoo se ha identificado un número bajo de unidades de transcripción ribosomal, aproximadamente 12 copias por genoma haploide, que tienen como característica principal la fragmentación del gen 28S en seis o siete segmentos independientes de diversos tamaños (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2001), lo que sugiere la presencia de eventos extra durante el procesamiento del rRNA. En este sentido, se ha sugerido que los tripanosomátidos podrían no sólo contener los snoRNAs clásicos encontrados en otros eucariotas, sino también snoRNAs específicos de esta familia de protozoos (Chikne, *et al.*, 2019).

En general, muy pocos factores de ensamble ribosomal han sido caracterizados funcionalmente en tripanosomátidos, la gran mayoría de estos estudios fueron hechos en *T. brucei*, otro cinetoplástido patógeno del humano. Con el interés de estudiar el nucléolo y la síntesis de las subunidades ribosomales en *L. major*, nosotros empleamos la proteína recombinante LmNop56-PTP, como una especie de anzuelo molecular, para purificar por afinidad en tándem los complejos proteicos que interaccionan *in vivo* con Nop56 (Figura 41). La identidad de las moléculas aisladas fue determinada por espectrometría de masas y análisis bioinformáticos. Se encontraron los cuatro elementos que forman el *core* proteico de snoRNAs caja C/D en eucariotas: Snu13 (LmjF.15.1470), Nop58 (LmjF.15.1380), Fibrilarina (LmjF.36.3070 y LmjF.19.0100) y Nop56 (LmjF.10.0210). Es interesante la purificación de las dos isoformas de fibrilarina anotadas en el genoma de *L. major*, pues este hallazgo sugiere que las dos metiltransferasas son sintetizadas y pueden ser funcionales en los complejos catalíticos responsables de metilar el rRNA. También se co-purificaron las moléculas Cbf5, Nop10, GAR1 y NHP2, que forman el núcleo proteico de snoRNPs caja H/ACA (Watkins & Bohnsack, 2012), responsables de las pseudouridilaciones en los pre-RNA ribosomales, siendo Cbf5 (LmjF.21.1760) la enzima responsable de catalizar esta reacción química (Ojha, *et al.*, 2020).

Otras moléculas que se co-purificaron fueron las proteínas con dominios WD40. Se ha reportado que estos elementos están presentes en la mayoría de los eucariotas y que pueden participar en diversos procesos celulares como respuesta al daño del DNA, modificación de histonas, regulación de la transcripción, procesamiento de RNA, degradación de proteínas y apoptosis. Se sabe que los dominios WD40 son repeticiones de triptofano y ácido aspártico útiles para establecer interacciones proteína-proteína, confiriéndoles la función de proteínas reclutadoras (Zou, *et al.*, 2016). Dos proteínas con este tipo de dominio que fueron identificadas en este estudio corresponden a LmjF.34.0300 (RRP9) y LmjF.23.0030 (UTP15), ambas se han visto relacionadas con el procesamiento del rRNA en levadura. En cuanto a UTP15, se reportó que para *T. brucei* y *L. tarentolae* podría estar relacionada con la biogénesis ribosomal (Rajan, *et al.*, 2019).

Las helicasas de RNA son un grupo de enzimas que emplean ATP para modificar estructuras secundarias del rRNA y complejos ribonucleoproteicos snoRNA-rRNA. En este trabajo se lograron identificar ocho proteínas helicasas diferentes. Por ejemplo, la DBP1 (LmjF.32.0400), que es requerida en algunos mamíferos y anfibios para el correcto procesamiento del pre-rRNA (Calo, *et al.*, 2015), también se ha sugerido que, en *T. brucei* puede estar involucrada en la generación de la subunidad pequeña. Otra helicasa que también co-purificó fue la RNA helicasa II (LmjF.05.0140), la cual se une a diferentes RNAs, incluyendo a los snoRNAs como a los de caja C/D y H/ACA, incluso se ha reportado que interactúa con la Nop58 y Fibrilarina, además de las regiones del RNA conservadas de las cajas C/D y que tiene un papel, aunque no muy claro, en la biogénesis ribosomal (Calo, *et al.*, 2015). Otras RNA helicasas encontradas en nuestro trabajo fueron; DBP1 (LmjF.32.0400), helicasa de RNA dependiente de ATP (LmjF.35.0370), Helicasa II (LmjF.05.0140), DBP9 (LmjF.24.0250) y DDX23 (LmjF.35.3100). Evidentemente, son necesarios nuevos estudios para determinar el papel que juegan estas RNA helicasas durante la biogénesis de las subunidades ribosomales en *L. major*.

También se lograron identificar seis proteínas relacionadas con el snoRNA U3, como LmjF.29.0750 que se ha descrito en levaduras con el nombre de MMP10. Esta proteína es parte del complejo Mpp10-Imp3-Imp4 presente en el proceosoma de la subunidad menor del ribosoma, en donde ayuda a la maduración del rRNA 18S (Zhao, *et al.*, 2019).

Adicionalmente, se co-purificaron siete proteínas nucleolares, algunas de las cuales son realmente interesantes de estudio, por ejemplo; Nop52 o RRP1 (LmjF.16.0890) la cual participa activamente en la escisión del sitio ITS2 en levadura, contribuyendo así a la formación de la subunidad 60S (Savino, *et al.*, 1999). También encontramos a ESF1 (LmjF.36.6520) que es requerida para el corte en los sitios A0, A1 y A2 en el procesamiento del pre-rRNA 35S (en levadura), se ha visto relacionada con snoRNAs U3 y U14, así como otras proteínas que forman parte del proceosoma de la subunidad menor (Turowski & Tollervy, 2015). Se identificaron moléculas que se relacionan directamente con la biogénesis de la subunidad 60S, siete de las cuales son de importancia para la maduración de pre-rRNA 60S debido a que ayudan al procesamiento del pre-rRNA o son reguladoras de la transcripción del mismo. Si bien no se sabe con exactitud el papel de todas las proteínas involucradas en la biogénesis ribosomal, se detectó el dominio Brix, que está presente en varios de los polipéptidos que fueron aislados en esta investigación (Tabla 5). Al respecto, podemos mencionar como ejemplos a RPF2 (LmjF.26.0010), BRX1 (LmjF.20.1670), RPF1 (LmjF.27.0450) y EBP2 (LmjF.35.1820). Se sabe que la presencia o ausencia de la proteína EBP2 en levaduras causa diferencias en la composición de factores asociados a la maduración del rRNA 60S (Lebreton *et al.*, 2008). Adicionalmente, fue identificada la proteína MRT4 de levadura (LmjF.36.4650, en *L. major*). Este elemento forma parte de la maquinaria de ensamble ribosomal y ha sido catalogado como un factor común presente en la subunidad grande del ribosoma (Rajan, *et al.*, 2019).

De las proteínas purificadas, se encontraron varias con dominios de unión al RNA, dentro de éstas tenemos a las proteínas de la familia pumilio que se caracterizan

por la presencia de repeticiones de determinados aminoácidos conocidas como Pum que están altamente conservadas y le permiten la interacción con distintas clases de RNA. Estas proteínas se han visto relacionadas en varios procesos celulares incluyendo la biogénesis ribosomal en los parásitos causantes de la malaria, por lo que su aparición en nuestros resultados no es extraña (Liang, *et al.*, 2018).

Ha sido descrito que una de las funciones principales de las GTPasas, que también se han conservado a lo largo de la evolución, es actuar como control de calidad y evitar la asociación de factores no deseados o no funcionales durante el ensamble de la subunidad mayor del ribosoma, asegurando que el sitio activo de éstos (centro peptidil transferasa) sea correctamente generado (Hillen, *et al.*, 2021). En este sentido, la eliminación de la GTPasa Nog1 de levadura produce una alteración negativa en los niveles de factores como NSA2, MRT4, NUG1, NOP53, ARX1 y NOG2, relacionados con el procesamiento del precursor ribosomal grande (Lebreton, *et al.*, 2018). En nuestras purificaciones encontramos el ortólogo de Nog1 (LmjF.33.1870) además de las proteínas RRS1 (LmjF.30.0620), YTM1 (LmjF.31.0200), NSA1 (LmjF.09.0005), NSA2 (LmjF.24.2070; LmjF.24.2080), TIF6 (LmjF.36.0890) que se reportan en Lebreton *et al.*, 2008 y en Chikne *et al.*, 2019. Estas moléculas participan activamente en diversas etapas de la biogénesis ribosomal.

Las cinasas son otro grupo de proteínas que regulan diferentes procesos celulares mediante la adición de un grupo fosfato a alguna proteína o azúcar. Una de las cinasas encontradas en este trabajo pertenece al grupo de las adenilato cinasas nucleares (LmjF.21.1250), quienes conservan estructuras, funciones y dominios en organismos que van desde bacterias hasta vertebrados. Como se sugiere en Cámara *et al.*, 2013, la adenilato cinasa nuclear de *T. cruzi* (TcADKn) puede tener un papel en los últimos pasos de la maduración del pre-rRNA 20S.

Otro grupo de proteínas aisladas son las de choque térmico, que son de gran importancia para la viabilidad de los parásitos debido a que son sobre-expresadas cuando cambian de un hospedero a otro; algunas más actúan como chaperonas moleculares de otras proteínas que se relacionan con la respiración celular y ha sido descrito que son el blanco de anticuerpos de los hospederos recién infectados (Bringaud, *et al.*, 1995). Estas proteínas se han visto relacionadas con varios procesos celulares incluyendo la biogénesis ribosomal. Aquí, nosotros purificamos la proteína de choque térmico hsp70 (LmjF.28.2770), ortólogo de GRP78 (Tb927.11.11290) de *T. brucei* que aparentemente contribuye en la biogénesis de la subunidad pequeña del ribosoma (Rajan, *et al.*, 2019). Esta observación es similar a lo reportado en levadura, en donde se encontró que la ausencia de hsp70 obstaculiza los últimos pasos de la biogénesis ribosomal al reducir los niveles del rRNA 5S y el procesamiento del pre-rRNA 27S en levaduras (Mudholkar, *et al.*, 2017).

Se encontraron 25 proteínas hipotéticas, las cuales no han sido caracterizadas ni tampoco existe suficiente conocimiento acerca de sus funciones por lo que no podemos aún visualizar una relación con la biogénesis ribosomal. Algunas como la LmjF.36.2480 se encuentran anotadas en la base de datos de los tripanosomátidos como proteínas que tienen un dominio de unión al RNA, fenómeno que es interesante debido a que esta molécula podría estar involucrada en la maduración del rRNA. Nuevos estudios son necesarios para aclarar si este grupo de elementos tiene algún rol en la biogénesis de las subunidades ribosomales, especialmente en la 60S. De manera interesante, LmjF.04.0490 y LmjF.22.1610 sólo se han reportado en miembros de la familia *Trypanosomatidae* o de la subclase Metakinetoplastina (LmjF.26.1300 y LmjF.13.0900). La proteína Nop15 (LmjF.10.1030) se encuentra anotada en el genoma de algunos eucariotas como roedores, mariposas, algas, rotíferos y estrellas de mar pero sin estar presente en levaduras o humanos. El estudio de este set de proteínas hipotéticas podría contribuir al desarrollo de herramientas terapéuticas eficaces para combatir las enfermedades causadas por este grupo de parásitos patógenos del humano.

Adicionalmente, logramos aislar un gran número de las proteínas ribosomales estructurales que estarán presentes en las subunidades ribosómicas maduras. Es importante mencionar que algunos de estos elementos colaboran en distintos pasos del proceso de maduración del precursor ribosomal, por lo que su hallazgo es relevante y contribuye a conocer mejor el proceso de la biogénesis del ribosoma en *L. major*.

En la actualidad es ampliamente aceptado que el nucléolo es un cuerpo nuclear multifuncional que regula un número importante de eventos celulares fundamentales, como la síntesis y procesamiento de mRNAs (Pederson 2010). Entre las numerosas proteínas que aislamos en nuestro experimento, se encuentran algunas que están asociadas al mRNA, como YRA1 (LmjF.27.2100) que es indispensable para el procesamiento de mRNA recién sintetizado, y se une a éste por la acción de la RNA helicasa Dbp2 (LmjF.07.0340; también encontrada en este trabajo) (Ma, *et al.*, 2013). El hallazgo de moléculas involucradas en procesos extra-ribosomales refuerza la hipótesis de que el nucléolo de *L. major* es plurifuncional. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para confirmar esta observación.

Logros y conclusiones

- LmNop56 (LmjF.10.0210) conserva los tres dominios característicos de la proteína: NOSIC, Nop y NOP5NT.
- La estructura tridimensional del LmNop56 resultó tener una alta similitud con su ortólogo en *S. cerevisiae*.
- Se obtuvo la línea celular LmNop56-PTP.
- Se verificó que LmNop56-PTP se expresa correctamente y en el sitio esperado (el nucléolo) mediante ensayos WB e inmunofluorescencia.
- Experimentos de purificación por afinidad en tándem permitieron corroborar que las proteínas que integran la snoRNP de caja C/D (a la que pertenece Nop56) se asocian con la proteína de interés.
- Se logró identificar una gran cantidad de proteínas que probablemente interactúen con Nop56 y que participan en alguna etapa de la biogénesis de las dos subunidades ribosomales.
- Se identificaron proteínas exclusivas de tripanosomátidos que podrían ser empleadas como blanco para fármacos que ayuden a combatir las enfermedades infecciosas causadas por este grupo de organismos.

Referencias consultadas

- Aittaleb, M., Rashid R., Chen Q., Palmer J., Daniels C. J., Li H. (2003). Structure and función of archaeal box C/D sRNP core proteins. *Nature Structural Biology*, 10(4), 256-263. <https://dx.doi.org/10.1038/nsb905>
- Ambit, A., Woods, K. L., Cull, B., Coombs, G. H. & Mottram, J. C. (2011). Morphological events during the cell cycle of *leishmania major*. *Eukaryotic Cell*, 10(11), 1429–1438. <https://doi.org/10.1128/EC.05118-11>
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Besteiro, S., Williams, R. A. M., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1063–1075. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.03.008>
- Borghi, S. M., Fattori, V., Conchon-Costa, I., Pinge-Filho, P., Pavanelli, W. R., & Verri, W. A. (2017). *Leishmania* infection: painful or painless? *Parasitology Research*, 116(2), 465–475. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5340-7>
- Bringaud, F., Peyruchaud, S., Baltz, D., Giroud, C., Simpson, L. & Baltz, T. (1995). Molecular characterizatoin of the mitochondrial heat shock protein 60 gene from *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 74, 119-123. <https://kdna.net/simpsonlab/Lab%20publications/pub115.pdf>
- Butenko, A., Kostygov, A. Y., Sádlová, J., Kleschenko, Y., Bečvář, T., Podešvová, L., MacEdo, D. H., Žihala, D., Lukeš, J., Bates, P. A., Volf, P., Opperdoes, F. R., & Yurchenko, V. (2019). Comparative genomics of *Leishmania* (Mundinia). *BMC Genomics*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6126-y>
- Calo, E., Flynn, R.A., Martin, L., Spitale, R.C., Chang, H.Y. & Wysocka, J. (2015). RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. *Nature*, 518(7538), 249-253. doi:10.1038/nature13923.
- Cámara, M.M., Bouvier, L.A., Canepa, G.E., Miranda, M.R. & Pereira, C.A. (2013). Molecular and functional characterization of a *Trypanosoma cruzi* nuclear adenylate kinase isoform. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(2),15.
- Chikne V., Rajan, K.S., Shalev-Benami, M., Decker, K., Cohen-Chalamish, S., Madmoni, H., Biswas, V.K., Gupta, S.K., Doniger, T., Unger, R., Tschudi, C., Ullu, E. & Michaeli, S. (2019). Small nucleolar RNAs controlling rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, 47(5), 2609-2629.
- Clayton, C. (2019). Regulation of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic transcription. *Open Biology*, 9(6), 24. <https://doi.org/10.1098/rsob.190072>

- Cortázar, T. M., & Walker, J. (2004). Manipulación genética y el estudio del parásito protozoario *Leishmania*. *Biomédica*, 24(4), 438. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i4.1293>
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes - Conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 251–261. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1097>
- Dundr, M., & Misteli, T. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochemical Journal*, 356(2), 297–310. <https://doi.org/10.1042/bj3560297>
- Eliaz, D., Doniger, T., Tkacz, I. D., Biswas, V. K., Gupta, S. K., Kolev, N. G., Unger, R., Ullu, E., Tschudi, C., & Michaeli, S. (2015). Genome-wide analysis of small nucleolar RNAs of *Leishmania major* reveals a rich repertoire of RNAs involved in modification and processing of rRNA. *RNA Biology*, 12(11), 1222–1255. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1038019>
- Fernández-Tornero, C., Moreno-Morcillo, M., Rashid, U. J., Taylor, N. M. I., Ruiz, F. M., Gruene, T., Legrand, P., Steuerwald, U., & Müller, C. W. (2013). Crystal structure of the 14-subunit RNA polymerase I. *Nature*, 502(7473), 644–649. <https://doi.org/10.1038/nature12636>
- Fiebig, M., Kelly, S., & Gluenz, E. (2015). Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. *PLoS Pathogens*, 11(10), 28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005186>
- Florencio-Martínez LE, Cano-Santiago A, Mondragón-Rosas F, Gómez-García M, Floresérez C, Román-Carraro FC, Barocio-Rodríguez LA, Manning-Cela RG, Nepomuceno-Mejía T, Martínez-Calvillo S. Participation of TFIIIB Subunit Brf1 in Transcription Regulation in the Human Pathogen *Leishmania major*. *Genes (Basel)*. 2021 Feb 16;12(2):280. doi: 10.3390/genes12020280.
- Rodriguez, A.E., Estévez, J.O., Nevot, M.C., Barrios, A., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2018). Parasitic protozoa of farm animals and pets. In *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets* (pp. 1–438). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5>.
- Gagnon, K. T., Biswas, S., Zhang, X., Brown, B. A., Wollenzien, P., Mattos, C., & Maxwell, E. S. (2012). Structurally conserved Nop56/58 N-terminal domain facilitates archaeal box C/D ribonucleoprotein-guided methyltransferase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19418–19428. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323253>
- Gautier, T., Berges, T., Tollervey, D., & Hurt, E. D. (1997). Nucleolar KKE/D Repeat Proteins Nop56p and Nop58p Interact with Nop1p and Are Required for Ribosome Biogenesis. *Molecular and cellular biology*, 17(12), 7088–7098. <http://mcb.asm.org/>

- Gray, S. G. (2015). Ribosomal RNA Methylation and Cancer. In G. Therizols, F. Laforêts, V. Marcel, F. Catez, P. Bouvet, & J.-J. Diaz (Eds.), *Epigenetic Cancer Therapy*. Academic Press. 748. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800206-3.00006-9>
- Hayano T., Yanagida, M., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Isobe, T. & Takahashi, N. (2003). Proteomic analysis of human Nop56p-associated pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes: Possible link between Nop56p and the nucleolar protein treacle responsible for Treacher Collins syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34309-34319.
- Hernandez-Verdun, D. (2006). Nucleolus: From structure to dynamics. *Histochemistry and Cell Biology*, 125(1–2), 127–137. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0046-4>
- Hernandez-Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus*, 2(3), 189–194. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.3.16246>
- Hillen H., Lavdovskaia, E., Nadler, F., Hanitsch, E., Linden, A., Bohnsack, K., Urlaub, H. & Richter-Dennerlein, R. (2021). Structural basis of GTPase-mediated mitochondrial ribosome biogenesis and recycling. *Nature communications*, 12(1), 10. <http://doi.org/10.1038/s41467-021-23702-y>
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzým, K., ... Myler, P. J. (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major* NIH Public Access. *Science* 309(5733), 436-442. www.sciencemag.org/cgi/content/full/309/5733/436/DC1
- Jamdhade, M. D., Pawar, H., Chavan, S., Sathe, G., Umasankar, P. K., Mahale, K. N., Dixit, T., Mandugundu, A. K., Prasad, K. T. S., Gowda, H., Pandey, A., & Patole, M. S. (2015). Comprehensive proteomics analysis of glycosomes from *Leishmania donovani*. *Journal of Integrative Biology*, 19(3). <https://www.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/omi.2014.0163>
- Kedzierski, L., Zhu, Y., & Handman, E. (2006). *Leishmania* vaccines: Progress and problems. *Parasitology*, 133, 87-112. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001831>
- Kiss-lászló, Z., Henry, Y., Bachellerie, J., Sabatier, P., & Cedex, T. (1996). Site-Specific Ribose Methylation of Preribosomal RNA: A Novel Function for Small Nucleolar RNAs. *Cell*, 85, 1077–1088.
- Kresoja-Rakic, J., & Santoro, R. (2019). Nucleolus and rRNA Gene Chromatin in Early Embryo Development. *Trends in Genetics*, 35(11), 868–879. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.06.005>

- Lebreton, A., Rousselle, J., Lenormand, P., Namane, A., Jacquier, A., Formont-Racine, M. & Saveanu, C. (2008). 60S ribosomal subunit assembly dynamics defined by semi-quantitative mass spectrometry of purified complexes. *Nucleic Acids research*, 36(15), 4988-4999.
- Lechertier, T., Grob, A., Hernandez-Verdun, D. & Roussel, P. (2009). Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs. *Experimental cell research*, 315(6), 928-942. doi:10.1016/j.yexcr.2009.01.016
- Liang X, Hart, K., Dong, G., Siddiqui, F.A. Sebastian, A., Li, X., Albert, I., Miao, J., Lindner, S. & Cui, L. (2018). Puf3 participates in ribosomal biogenesis in malaria parasites. *Cell Science*, 131(6), 11. doi:10.1242/jcs.212597
- Liang, X. H., Uliel, S., Hury, A., Barth, S., Doniger, T., Unger, R., & Michaeli, S. (2005). A genome-wide analysis of C/D and H/ACA-like small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei* reveals a trypanosome-specific pattern of rRNA modification. *Rna*, 11(5), 619–645. <https://doi.org/10.1261/rna.7174805>
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E. C., & Englund, P. T. (2005). Fellowship of the rings: The replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*, 21(8), 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.008>
- López-Velázquez, G., Hernández, R., López-Villaseñor, I., Reyes-Vivas, H., Segura-Valdez, M. D. L., & Jiménez-García, L. F. (2005). Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis*, 11(4), 293–299. <https://doi.org/10.1017/S1431927605050233>
- Lukeš, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., & Englund, P. T. (2002). Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*, 1(4), 495–502. <https://doi.org/10.1128/EC.1.4.495-502.2002>
- Ma W., Cloutier, S. & Tran, E. (2013). The DEAD-box protein Dbp2 functions with the RNA-binding protein Yra1 to promote mRNP assembly. *Molecular Biology*, 425(20), 3824-3838. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.05.016>
- Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L. E., & Nepomuceno-Mejía, T. (2019). Nucleolar Structure and Function in Trypanosomatid Protozoa. *Cells*, 8(421), 22. <https://doi.org/10.3390/cells8050421>
- Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L.E., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Vizuet-de-Rueda, J., Padilla-Mejía, N.E., Román-Carrero, F.C., Flores-Pérez, C., Manning-Cela, R.G. y Figueroa-Angulo, E.E. (2012). Estructura genómica y regulación de la expresión Genética en *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*. En M.E. Álvarez-Sánchez, y E. Azuara, *Genómica de parásitos, aspectos moleculares, genómicos, proteómicos y de virulencia* (pp. 47-79) Editorial Académica Española.

- Martínez-Calvillo, S., Saxena, A., Green, A., Leland, A., & Myler, P. J. (2007). Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*, 37(5), 491–502. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.019>
- Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S. feng, Fox, M., Stuart, K., & Myler, P. J. (2001). Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 116(2), 147–157. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00310-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00310-3)
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-De-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., & Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2010). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2010/525241>
- Maslov, D. A., Podlipaev, S. A., & Lukeš, J. (2001). Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic Problems and Insights into the Evolution of Parasitism. In *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96 (3), 397-402.
- Mcstay, B. (2016). Nucleolar organizer regions: genomic ‘dark matter’ requiring illumination. *Genes & development*, 30, 1598–1610. <https://doi.org/10.1101/gad.283838.116.1598>
- Michaeli, S. (2011). Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiology*, 6(4), 459–474. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.20>
- Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Nepomuceno-Mejía, T., Rojas-Sánchez, S., Vélez-Ramírez, D. E., Padilla-Mejía, N. E., Figueroa-Angulo, E., Manning-Cela, R., & Martínez-Calvillo, S. (2016). Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Parasitology*, 143(14), 1917–1929. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001712>
- Mudholkar, K., Fitzke, E., Prinz, C., Mayer, M. & Rospert, S. (2017). The Hsp70 homolog Ssb affects ribosome biogenesis via the TORC1-Sch9 signaling pathway. *Nature communications*, 8(1), 14. doi.10.1038/s41467-017-00635-z
- Nepomuceno-Mejía, T., Florencio-Martínez, L. E., & Martínez-Calvillo, S. (2018). Nucleolar Division in the Promastigote Stage of *Leishmania major* Parasite: A Nop56 Point of View. *BioMed Research International*, 2018, 1641839. <https://doi.org/10.1155/2018/1641839>
- Newman, D. R., Kuhn, J. F., Shanab, G. M., & Maxwell, E. S. (2000). Box C / D snoRNA-associated proteins: Two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription. *RNA*, 6, 861–879.
- Nguyen, T. N., Schimanski, B., & Günzl, A. (2007). Active RNA Polymerase I of *Trypanosoma brucei* Harbors a Novel Subunit Essential for Transcription.

Molecular and Cellular Biology, 27(17), 6254–6263.
<https://doi.org/10.1128/mcb.00382-07>

- Nguyen, T. N., Schimanski, B., Zahn, A., Klumpp, B., & Günzl, A. (2006). Purification of an eight subunit RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.02.023>

- Nunes, V. S., & Moretti, N. S. (2017). Nuclear subcompartments: an overview. *In Cell Biology International*, 41(1), 2–7. <https://doi.org/10.1002/cbin.10703>

- Ogbadoyi, E., Ersfeld, K., Robinson, D., Sherwin, T., & Gull, K. (1999). Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma*, 108, 501–513.

- Ojha, S., Malla, S., & Lyons, S. M. (2020). snoRNPs: Functions in Ribosome Biogenesis. *10(783)*, 28. Doi: 10.3390/biom10050783

- OMS. (2020). Leishmaniasis. *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

- Padilla-Mejía, N.E., Gómez-Hurtado, C.M., Sánchez-Santamaría, I.I., Florencio-Martínez, L.E., Manning-Cela, R.G. & Martínez-Calvillo, S. (2013). Comparative genomics of *Leishmania* parasites. En López-Camarillo, C. & Marchat, L.A. *Comparative genomics in neglected human parasites*. Nova Science Publishers, Inc.

- Parsons, M. (2004). Glycosomes: Parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *In Molecular Microbiology*, 53(3), 717–724. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04203.x>

- Pederson, T. (2010). Regulatory RNAs derived from transfer RNA? *RNA*, 16(10), 1865,1869. doi:10.1261/rna.2266510

- Pothirat, T., Tantiworawit, A., Chaiwarith, R., Jariyapan, N., Wannasan, A., Siritasatien, P., Supparatpinyo, K., Bates, M. D., Kwakye-Nuako, G., & Bates, P. A. (2014). First Isolation of *Leishmania* from Northern Thailand: Case Report, Identification as *Leishmania martiniquensis* and Phylogenetic Position within the *Leishmania enriettii* Complex. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(12), 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003339>

- Preußner, C., Jaé, N., & Bindereif, A. (2012). mRNA splicing in trypanosomes. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(4–5), 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.004>

- Rajan, K., Chikne, V., Decker, K., Ben-Asher, W.H. & Michaeli, S. (2019). Unique aspects of rRNA biogenesis in Trypanosomatids. *Trends in parasitology*, 35(10), 778-794. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.07.012>

- Roberts, L. J., Handman, E., & Foote, S. J. (2000). Clinical review Science, medicine, and the future Leishmaniasis, 321, 801-804. www.ebi.ac.uk/
- Rodríguez, T.G. (1983). Leishmaniasis. *Biomédica*. 3(3), 77-99. <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/1865/1891>
- Savino, T.M., Bastos, R., Jansen, E. & Hernandez-Verdun, D. (1999). The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleogenesis. *Cell science*, 112, 1889-1900.
- Schimanski B, Nguyen TN, Günzl A. Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot Cell*. 2005 Nov;4(11):1942-50.
- Sectorial De Salud, P. (2013). Programa de Acción Específico Prevención y Control de las Leishmaniasis 2013-2018.
- Sinclair, A. N., & de Graffenried, C. L. (2019). More than Microtubules: The Structure and Function of the Subpellicular Array in Trypanosomatids. *Trends in Parasitology*, 35(10), 760–777. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.07.008>
- Thiry, M. & Lafontaine, D. (2005). Birth of a nucleolus: The evolution of nucleolar compartments. *Trends in cell biology*, 15(4), 194-199. doi: 10.1016/j.tcb.2005.02.007
- Tomecki, R., Sikorski, P. J., & Zakrzewska-Placzek, M. (2017). Comparison of preribosomal RNA processing pathways in yeast, plant and human cells – focus on coordinated action of endo- and exoribonucleases. *FEBS Letters*, 591(13), 1801–1850. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12682>.
- Tomkuvienė, M., Ličytė, J., Olendraitė, I., Liutkevičiūtė, Z., Clouet-d'Orval, B., Klimašauskas, S. (2017). Archaeal fibrillarin-Nop5 heterodimer 2'-O-methylates RNA independently of the C/D guide RNP particle. *RNA*, 23(9), 1329-1337.
- Turowski, T., Tollervey, D. (2015). Cotranscriptional events in eukaryotic ribosome synthesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(1), 129-139. doi:10.1002/wrna.1263
- Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Padilla-Mejía, N. E., Manning-Cela, R., Hernández-Rivas, R., & Martínez-Calvillo, S. (2016). Ribosomal RNA Genes in the Protozoan Parasite *Leishmania major* Possess a Nucleosomal Structure. *Protist*, 167(2), 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.02.001>
- Watkins, N. J., & Bohnsack, M. T. (2012). The box C/D and H/ACA snoRNPs: Key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(3), 397–414. <https://doi.org/10.1002/wrna.117>

- Wheeler, R. J., Gluenz, E., & Gull, K. (2011). The cell cycle of *Leishmania*: Morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular Microbiology*, 79(3), 647–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x>
 - Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2003). The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biological Chemistry*, 384(4), 517–525. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.060>
- World Health Organization. Leishmaniasis 2020. Available in <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
- Zhao, S., Chen, Y., Chen, F., Huang, D., Shi, H., Lo, L., Chen, J. & Peng, J. (2019). Sas10 controls ribosome biogenesis by stabilizing Mpp10 and delivering the Mpp10-Imp3-Imp4 complex to nucleolus. *Nucleic Acids Research*, 47(6), 2996-3012. doi:10.1093/nar/gkz105
 - Zou, X., Hu, X., Ma, J., Li, T., Ye, Z. & Wu, Y. (2016). Genome-wide analysis of WD40 protein family in human. *Scientific reports*, 6(39262), 12. doi:10.1038/srep39262